



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

---

**Programa de Pós-Graduação: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica**  
**Área de Concentração: Tecnologia de Fermentações**

**Análise técnico-econômica para a produção**  
**de biofármacos de L-asparaginase**

Nicola Sgrignoli Fuganholi

Dissertação para obtenção do título de  
Mestre em Tecnologia Bioquímico-  
Farmacêutica.

**Orientador:** Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

**Co-Orientador:** Dr. Thomaz de Gouveia (IPT)

São Paulo

2020

Nicola Sgrignoli Fuganholi

**Análise técnico-econômica para a produção de biofármacos de  
L-asparaginase**

Comissão Julgadora da dissertação para obtenção do título de Mestre em Tecnologia  
Bioquímico-Farmacêutica:

---

Orientador/Presidente: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.

---

1º Examinador

---

2º Examinador

---

3º Examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2020.

**Autorizo a reprodução e a divulgação total ou parcial deste trabalho, por meios convencionais e/ou eletrônicos, para quaisquer fins relacionados à didática, estudo e pesquisa, desde que devidamente citada a fonte.**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F957a Fuganholi, Nicola Sgrignoli  
Análise técnico-econômica para a produção de biofármacos de  
L-asparaginase / Nicola Sgrignoli Fuganholi. -- São Paulo, 2020.  
97p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia  
Bioquímico-Farmacêutica - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia  
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Pessoa Junior, Adalberto

Co-Orientador: Gouveia, Thomaz de

1. L-asparaginase. 2. Análise técnico-econômica. 3. Bioprocesso.  
4. Simulação. 5. Erwinase. I. T. II. Pessoa Junior, Adalberto,  
orientador. III. Gouveia, Thomaz de, Co-Orientador.

## **Agradecimentos**

Muito além deste projeto de dissertação e refletindo em todos que fizeram parte de minha trajetória, oferecendo e proporcionando apoio, privilégios e, principalmente, sempre depositando confiança em meus planos e decisões, agradeço imensamente à minha família por sempre estar ao meu lado, em especial: minha mãe Valéria, minhas irmãs e meu pai (em memória).

Agradeço, também, aos meus amigos e às pessoas especiais que rodeiam a minha vida, por sempre estarem comigo, proporcionando todos os incentivos, apoios e ajudas para dar conta de tantas atividades que aconteceram nos últimos anos.

Agradeço, também, a todos os professores que passaram por meu caminho e que com certeza contribuíram à minha formação nos mais variados aspectos.

Ao nosso grupo de pesquisa, agradeço pelo acolhimento, pela paciência, pela disponibilidade e pela parceria quando necessário. Presto minha gratidão especialmente ao Professor Adalberto, por ter acolhido o projeto e me acompanhado durante este percurso, e também a importantes e brilhantes profissionais que cruzaram meu caminho, principalmente: Larissa, Rafael, Professor Adriano e Adamo.

Ao Universo agradeço pela oportunidade de conviver e receber tantas pessoas especiais, que confiam, suportam e apostam em minhas decisões.

## RESUMO

FUGANHOLI, N. S. **Análise Técnico-Econômica para a produção de biofármacos de L-asparaginase.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2021.

A enzima L-asparaginase é comumente utilizada como biofármaco para o tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda e possui altas taxas de cura com o medicamento disponível no mercado. Atualmente a aquisição deste biofármaco é fruto integral de importação, não sendo realizada produção nacional, muito embora existam grupos de pesquisas nacionais que trabalham em pesquisas e no desenvolvimento de biofármacos alternativos da L-asparaginase. Assim, a presente dissertação tem como objetivo realizar análises técnico-econômicas para avaliar a viabilidade de implementação industrial de bioprocessos para a produção da L-asparaginase do tipo Erwinase PEGuilada e não PEGuilada, que foram previamente desenvolvidos na FCF-USP. As análises técnico-econômicas foram conduzidas por meio do *software* SuperPro Design® (Intelligen, Inc.) e permitiram adaptar o processo laboratorial para um processo piloto e possibilitaram estimar os valores de custo de produção unitário (*Unity Cost of Production* – UPC) de US\$ 12,37/mg e US\$ 3,46/mg para a L-asparaginase monoPEGuilada e nativa obtida por processo similar, respectivamente. O custo unitário de produção para a enzima peguilada foi, portanto, estimado em cerca de 4 vezes o mesmo custo para a produção da enzima peguilada, sendo tal aumento de custo devido às operações de peguilação, já que ambas as plantas foram mantidas nas mesmas dimensões. Ainda, foram obtidos indicadores econômicos, que indicam a atratividade do processo desenvolvido, muito embora tenham sido identificados diversos gargalos de processo e fatores a serem otimizados e melhorados de forma a tornar o processo mais atrativo sob os pontos de vista técnico e econômico. Em uma análise de sensibilidade preliminar um aumento factível da densidade celular já mostra que é possível reduzir em mais de 30% o UPC. De toda forma, ainda que não otimizado, o processo apresentou valores e dados compatíveis com os biofármacos de L-asparaginase já disponíveis no mercado.

**Palavras-chave:** L-asparaginase. Análise técnico-econômica. Bioprocesso. Simulação. Erwinase.

## ABSTRACT

FUGANHOLI, N. S. **Technical-Economic analysis for the production of L-asparaginase biopharmaceuticals.** 2021. Thesis (Master Degree) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2021.

The enzyme L-asparaginase is commonly used as a biopharmaceutical in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia, presenting high cure rates with the formulations available on the market. Nowadays, the acquisition of this biopharmaceutical is only from importation, given that there is no national production being carried out, although there are national research groups working on research and development of alternative L-asparaginase biopharmaceuticals. Thus, this project aims at carrying out technical-economic analyzes to evaluate the viability of industrial implementation of bioprocesses for the production of L-asparaginase of the PEGylated and non-PEGylated Erwinase type previously developed at FCF-USP. The technical-economic analyzes, conducted by means of the software SuperPro Design® (Intelligen, Inc.), allowed to adapt the laboratory process to a pilot process and made it possible to estimate the unit cost of production (UPC) values of US \$ 12.37 / mg and US \$ 3.56 / mg for monoPEGylated L-asparaginase and bare obtained by similar process, respectively. The unit cost of production for the pegylated enzyme was, therefore, estimated at about 4 times the same cost for the production of the pegylated enzyme, such an increase in cost due to pegylation operations, since both plants were maintained in the same dimensions. Moreover, economic indicators were obtained, which indicate the attractiveness of the developed process. However, several process bottlenecks and factors to be optimized and improved were identified to make the process more attractive from the technical and economic point of view. In a preliminary sensitivity analysis, a feasible increase in cell density already shows that it is possible to reduce UPC by more than 30%. Accordingly, although not optimized, the process presented values and data compatible with the L-asparaginase biopharmaceuticals already available on the market.

**Keyword:** L-asparaginase. Technical-economic analysis. Bioprocess. Simulation.  
Erwinase.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Linha do tempo do uso da L-asparaginase no tratamento da LLA.....	17
<b>Figura 2.</b> Conversão da L-asparagina em aspartato por ação enzimática da L-asparaginase.	18
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de ação da ASNase como agente quimioterápico. ....	18
<b>Figura 4.</b> Fluxograma geral do processo de produção da L-asparaginase de <i>Erwinia chrysanthemi</i> (Erwinase®) –Adaptado da patente US 4,729,957.....	24
<b>Figura 5.</b> Cadeia de desenvolvimento de um biofármaco, desde a fase de desenvolvimento inicial (acadêmico) até a sua disponibilização ao mercado, passando por todas as fases mais comuns e mandatórias de um processo de desenvolvimento e lançamento de um biofármaco. ....	26
<b>Figura 6.</b> Tabela representativa da evolução do mercado global de biofármacos, entre o período de 2003 a 2018.. ....	27
<b>Figura 7.</b> Representação gráfica do faturamento em produtos biotecnológicos em 2019 pelas 10 maiores empresas da área. ....	28
<b>Figura 8.</b> Relação de medicamentos biológicos para produção no Brasil por meio de PDPs estabelecidas.....	31
<b>Figura 9.</b> Tabela comparativa entre características contrastantes entre processos químicos convencionais e bioprocessos.....	34
<b>Figura 10.</b> Etapas para a estimativa de capital de investimento e de custo operacional envolvidos em um processo de produção.....	37
<b>Figura 11.</b> Gráfico representativo do montante de capitais e custos envolvidos em um processo e as relações dos indicadores econômicos sobre a lucratividade de um processo. ....	42
<b>Figura 12.</b> Etapas para a construção de uma simulação de processo em software simulador. Adaptado de Heinzle, Biber e Cooney, 2006. ....	44
<b>Figura 13.</b> Diagrama de blocos das principais operações envolvidas no processo de produção de L-asparaginase do tipo Erwinase PEGuilada e purificada desenvolvido por Torres-Obreque (2017). ....	46
<b>Figura 14.</b> Diagrama de blocos das principais operações envolvidas no processo de produção de L-asparaginase do tipo Erwinase purificada, baseado no processo desenvolvido por Torres-Obreque (2017). ....	49

<b>Figura 15.</b> Fluxograma de processo para a produção de L-asparaginase monoPEGuilada elaborado pelo software SuperPro Design®, baseado em Torres-Obreque (2018), compreendendo as etapas do upstream ao downstream, sem considerar as operações e etapas de envase. ....	55
<b>Figura 16.</b> Fluxograma de processo para a produção de L-asparaginase nativa elaborado pelo software SuperPro Design®, adaptado com base em Torres-Obreque (2017). ....	56
<b>Figura 17.</b> Diagrama de bloco ilustrativo das operações envolvidas em produções industriais de enzimas .....	59
<b>Figura 18.</b> Diagrama de Gantt (batelada única) para o processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada, em que as barras azuis escuras se referem a cada operação unitária e as barras azuis claras se referem aos procedimentos dentro de cada uma das operações unitárias, listadas no eixo vertical da imagem. ....	65
<b>Figura 19.</b> Diagrama de Gantt (batelada única) para o processo de produção de L-asparaginase nativa, em que as barras azuis escuras se referem a cada operação unitária e as barras azuis claras se referem aos procedimentos dentro de cada uma das operações unitárias, listadas no eixo vertical da imagem. ....	67
<b>Figura 20.</b> Diagrama de ocupação de equipamentos (bateladas múltiplas) para o processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada, em que cada cor se refere a uma batelada, conforme legenda, sendo representadas quatro sucessivas bateladas. As barras horizontais se referem aos equipamentos indicados no eixo vertical.....	68
<b>Figura 21.</b> Diagrama de ocupação de equipamentos (bateladas múltiplas) para o processo de produção de L-asparaginase nativa, em que cada cor se refere a uma batelada, conforme legenda, sendo representadas quatro sucessivas bateladas. As barras horizontais se referem aos equipamentos indicados no eixo vertical. ....	69
<b>Figura 22.</b> Composição dos custos operacionais para o processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada e detalhamento da composição dos custos de matéria-prima (custos do mesmo grupo foram reunidos para evitar gráfico com muitos itens separadamente).....	72
<b>Figura 23.</b> Composição dos custos operacionais para o processo de produção de L-asparaginase nativa e detalhamento da composição dos custos de matéria-prima (custos do mesmo grupo foram reunidos para evitar gráfico com muitos itens separadamente). ....	73
<b>Figura 24.</b> Custo de produção unitário (UPC), em dólar, da L-asparaginase monoPEGuilada produzida por processos em função de diferentes concentrações celulares na fermentação. ...	75

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Protocolo de tratamento de LLA no mundo.....	20
<b>Tabela 2.</b> Características dos principais biofármacos de L-asparaginase in vivo. ....	21
<b>Tabela 3.</b> Preços disponíveis por uma unidade de biofármacos de L-asparaginase.....	22
<b>Tabela 4.</b> Dados necessários e fontes de aquisição para análise econômica.....	38
<b>Tabela 5.</b> Custos das operações e composição de cada item em relação ao custo total .....	39
<b>Tabela 6.</b> Principais parâmetros e dados do processo de Torres-Obreque (2017, 2019) utilizados na simulação.....	52
<b>Tabela 7.</b> Dados para volumes úteis para o fermentador principal e para o pré-inóculo. ....	53
<b>Tabela 8.</b> Dados das massas de alimentação dos fermentadores, por batelada, considerando cada um dos componentes do meio LB.....	53
<b>Tabela 9.</b> Sumário executivo dos processos simulados, compreendendo dados gerados pelo SuperPro Design® para os processos (1): enzima PEGuilada e (2): enzima nativa. ....	61
<b>Tabela 10.</b> Estimativas do custo por miligrama de diferentes biofármacos de L-asparaginase disponíveis: Spectrila®, Leuginase® e Oncaspar®.....	62
<b>Tabela 11.</b> Relação dos custos operacionais envolvidos no processo de produção da L-asparaginase monoPEGuilada.....	71
<b>Tabela 12.</b> Relação dos custos operacionais envolvidos no processo de produção da L-asparaginase nativa.....	71
<b>Tabela 13.</b> Indicadores econômicos obtidos pela simulação no SuperPro Design® para os processos com e sem PEGuilção. ....	76

## Lista de Abreviações

ASNase	L-asparaginase
BDK	(do inglês <i>Batch Design Kit</i> )
BNDES	Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social
CAPEX	Custo de Capital Fixo (do inglês <i>Capital Expenditures</i> )
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EMA	Agência de Medicina da Europa (do inglês <i>European Medicines Agency</i> )
FDA	Agência Norte Americana de Medicamentos e Alimentos (do inglês <i>Food and Drugs Administration</i> )
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MIT	Instituto de Tecnologia de Massachussets (do inglês <i>Massachussets Institute of Technology</i> )
mPEG-NHS	Metóxi-poli(etileno)glicol carboximetil <i>N</i> -hidroxisuccinimidil éster
OPEX	Custos Operacionais (do inglês <i>Operating Expenditures</i> )
P&D	Pesquisa & Desenvolvimento
PBM	Programa Brasil Maior
PDP	Parceria para Desenvolvimento Produtivo
PEG	Poli(etileno)glicol
ROI	Retorno Sobre Investimento
SEC	Cromatografia Líquida de Exclusão por Tamanho (do inglês <i>Size Exclusion Chromatography</i> )
SUS	Sistema Único de Saúde
UPC	Custo de Produção Unitário (do inglês <i>Unity Cost of Production</i> )
VPL	Valor Presente Líquido

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
3.1. L-ASPARAGINASE E LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	16
3.2. A produção de biofármacos – panorama de produção e mercado.....	25
3.3. ANÁLISES TÉCNICO-ECONÔMICAS DE BIOPROCESSOS.....	32
3.3.1 Simulação e Modelagem .....	33
3.3.2 Avaliação Econômica de Bioprocessos.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
4.1. <i>Software</i> de Simulação e Modelagem .....	44
4.1.1. Processo base de simulação .....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	50
5.1. Dimensionamento da planta e do processo .....	50
5.2. Simulação e modelagem dos bioprocessos em análise .....	52
5.3. Análise geral dos processos.....	61
5.4. Análise econômica dos processos .....	71
6 CONCLUSÃO .....	78
7 ETAPAS FUTURAS .....	80
Bibliografia.....	81
ANEXO A.....	88
ANEXO B .....	90
ANEXO C .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da indústria biotecnológica intensificado a partir da década de 1970, tem sido o responsável por inúmeras inovações em medicamentos e sistemas diagnósticos, os quais permitiram o desenvolvimento de biofármacos, que progressivamente ganham o mercado, aumentando a receita e o lucro de grandes empresas e sendo alvo de inúmeros investimentos. A chamada “economia biotecnológica” é vista como uma área promissora a ser ainda mais desenvolvida no século XXI, influenciando setores relacionados ao sistema regulatório, às patentes, a transações e a apoios financeiros (como *venture capital*) (Huttner, 1999).

Neste contexto, o Brasil apresenta participação pouco expressiva no setor, tendo apresentado alguns entraves e obstáculos que precisam ser superados, como o aumento do parque industrial biotecnológico; a ampliação do espectro de tratamento medicamentoso; e maior especialização de recursos humanos nessa área tecnológica. O aumento da importância dos produtos biológicos na área da saúde, assim como a baixa produção destes em território nacional, foram responsáveis por um aumento, entre 2005 e 2010, de 37% nos gastos públicos do Ministério da Saúde, o que correspondeu a 60% do seu orçamento destinado à compra de medicamentos (Salerno, Matsumoto e Ferraz, 2018).

Já em 2021, estima-se que o Ministério da Saúde terá um gasto com vacinas contra a covid-19, que estão dentre somente um dos produtos biológicos obtidos pelo Ministério da Saúde, de até 20 bilhões de reais, gerando um aumento ainda mais expressivo dos custos direcionados a produtos biológicos (Bonomi, 2020).

Os biofármacos representam importantes meios para o tratamento de doenças que requerem o uso de hormônios de crescimento; insulina; anticorpos monoclonais; além de serem responsáveis pelo tratamento e pela prevenção de doenças como Alzheimer, câncer, diabetes e hepatite (Madeira, Borschiver e Pereira Jr, 2013).

Dentre os inúmeros biofármacos existentes está a L-asparaginase (ASNase), uma enzima utilizada no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). A LLA consiste basicamente, na produção de células brancas anormais, conhecidas como linfócitos. Esta doença afeta majoritariamente crianças e o atual tratamento disponível resulta em taxa de sobrevivência de aproximadamente 90%. Este tratamento ocorre por meio de quimioterapia, sendo a L-asparaginase o mais importante biofármaco utilizado (Lopes et al., 2015). A enzima em

referência não dispõe de produção nacional e apresenta altos custos para a importação, quando comparados com os valores dos fármacos tradicionais.

A L-asparaginase é uma enzima capaz de converter o aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia, diminuindo a concentração do referido aminoácido no sistema sanguíneo, o qual é essencial, em grandes quantidades, para a manutenção do rápido crescimento das células malignas. As células anômalas são incapazes de produzir o aminoácido e, na ausência deste no meio externo, são levadas à apoptose. Os dois principais tipos de L-asparaginase mais amplamente utilizados, a Erwinase e a L-asparaginase nativa, apresentam estruturas tetraméricas e têm o mesmo mecanismo de ação, além de apresentarem baixa toxicidade quando comparada às variações de similares desta enzima (Narta, Kanwar e Azmi, 2007).

A enzima em referência, no entanto, não conta com produção nacional, de modo que sua aquisição é integralmente obtida por importação, que apresenta expressivos custos, quando comparados a valores de medicamentos tradicionais. Em 2016, por exemplo, os biofármacos representaram 20% do mercado farmacêutico, atingindo mais de 250 bilhões de dólares em vendas globais (Salerno, Matsumoto e Ferraz, 2018).

Embora a produção nacional de biofármacos seja muito menos expressiva em relação a de diversos outros países, há grupos de pesquisas brasileiros com perfis multidisciplinares que envolvem pesquisadores de importantes universidades e institutos de pesquisa que continuam a explorar e a pesquisar novas rotas para a produção da L-asparaginase, intra e extracelular, visando à sua produção a partir de fungos e/ou bactérias (Pessoa-Junior et al., 2014). Considerando a importância desta enzima e, ainda, os altos custos gerados por sua importação, é fundamental avaliar novas perspectivas de produção local, a fim de garantir o suprimento nacional de forma independente (Zenatti et al., 2018). São constantemente buscadas melhores enzimas de L-asparaginase compreendendo, por exemplo, características melhoradas, como atividade de glutaminase eliminada ou reduzida, resistência a proteases, estabilidades em geral e baixa imunogenicidade, de modo que diversos processos têm sido desenvolvidos para prover novas possibilidades de biofármacos melhorados de L-asparaginase (Brumano et al., 2019).

As pesquisas em busca de novas opções de medicamentos de L-asparaginase, além de buscarem moléculas com propriedades melhoradas e efeitos adversos mais amenos, também são importantes para garantir a independência de suprimento deste biofármaco e na gestão, por exemplo, de garantia de qualidade. Neste contexto, dentre as diversas pesquisas, sobretudo nacionais, voltadas ao desenvolvimento de novos biofármacos de L-Asparaginase, torna-se

essencial avaliar seus processos nos mais diversos aspectos para tornar os estudos e pesquisas mais atrativos.

Um dos principais aspectos a serem avaliados para uma possível produção de um novo biofármaco é a avaliação técnico-econômica, que tem como objetivo analisar possibilidades de otimizar o processo, avaliar suas características e comparar diferentes rotas, demandas e modificações. Tais avaliações são fundamentais para identificar gargalos de processos, de modo a direcionar os esforços de PD&I para aperfeiçoamentos. Essas estimativas são utilizadas também para mensurar tempo de produção, assim como simular diferentes demandas, impactos oriundos de variações nas variáveis e condições de processo no custo de produção, servindo como importantes indicadores nas tomadas de decisões sobre começar ou continuar determinada produção (Heinzle et al., 2006; Petrides et al., 2014; Petrides et al., 2002).

Neste contexto, é levada em consideração a presença de tecnologia nacional para a produção da L-asparaginase. O presente estudo consiste nas avaliações das viabilidades de produções em larga escala de biofármacos de L-asparaginase, sob os pontos de vista técnico e econômico.

## 2 OBJETIVOS

### **Geral:**

Elaboração de análises técnico-econômicas para processos biotecnológicos de produção de biofármacos de L-asparaginase, por meio de simulação em *software* de processo, levando-se em consideração as etapas do *upstream* ao *downstream* (pré-inóculo à purificação final), os custos operacionais e o custo de capitais envolvidos em plantas projetadas para a produção dos mesmos.

### **Objetivos Específicos:**

- Comparação técnica e econômica entre os processos de produção de L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* PEGuilada e purificada utilizando *Escherichia coli* recombinante e de L-asparaginase de *E. chrysanthemi* purificada utilizando *E. coli* recombinante.
- Simulação do processo em *software* e análise econômica, visando à estimativa do custo de produção por unidade de massa de L-asparaginase;
- Geração de relatórios de produção e de fatores econômicos dos processos;
- Avaliação do impacto da PEGuilada no custo de produção do biofármaco;
- Levantamento e discussão de pontos e operações ineficazes dos processos;
- Análise de sensibilidade do custo em função da densidade celular de fermentação.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. L-ASPARAGINASE E LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Leucemias, em geral, são doenças que acometem as células sanguíneas, levando ao acúmulo e substituição de células sanguíneas saudáveis. Dentre os diversos tipos de leucemia que existem, as mais frequentes são a leucemia linfoblástica aguda, a leucemia mieloide aguda, a leucemia mieloide crônica e a leucemia linfocítica crônica (Brumano et al., 2019).

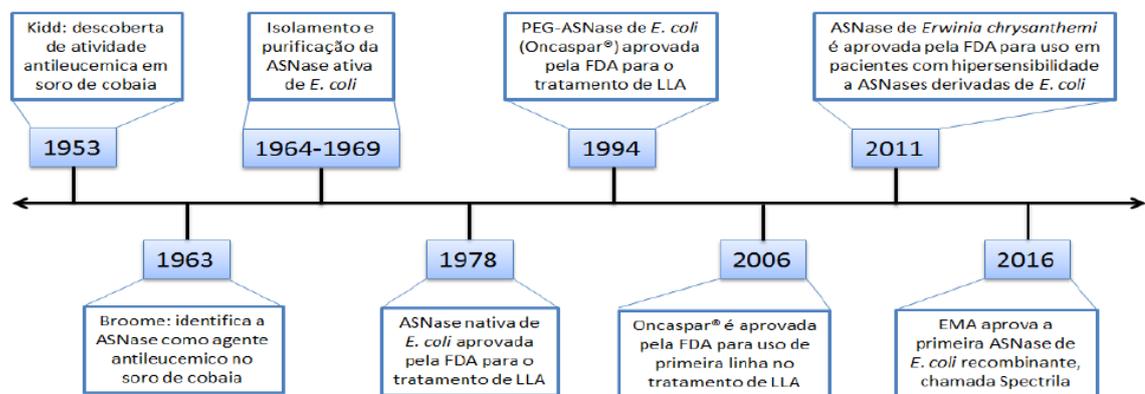
A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é um tipo de câncer sanguíneo que acomete cerca de 3 em cada 100.000 pessoas, sendo 10,8% dos diagnosticados menores de 20 anos e, ainda, mais especificamente entre 3 e 10 anos de idade (Ali et al., 2016; Avramis, 2012; Narta et al., 2007). Este tipo de câncer consiste, basicamente, na propagação de mutações ocorridas em células sanguíneas dos tipos mieloide ou linfoide por meio de crescimento celular acelerado e incontrolável das mesmas, levando ao comprometimento das funções das células sanguíneas (Narta et al., 2007).

No Brasil, estima-se que são diagnosticados cerca de 3.000 novos pacientes anualmente com LLA (Zenatti et al., 2018). Neste sentido, a L-asparaginase é um dos biofármacos utilizados como agente terapêutico no combate da LLA, sendo usada em associação com outros agentes neoplásicos, como linha principal pelos protocolos de tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e chegando a alcançar taxas de 90% de sucesso no tratamento (NATS, 2016).

A atividade antineoplásica da enzima L-asparaginase foi inicialmente observada por Kidd em 1953, por meio da constatação da atividade inibitória no crescimento de células tumorais de ratos do soro de porquinhos da Índia. McCoy e Neuman (1956) observaram que o crescimento destas células depende da disponibilidade de L-asparagina na corrente sanguínea. Somente mais tarde, em 1961, Broome compreendeu que a regressão das células cancerosas era em função da ação específica da L-asparaginase (Avramis, 2012; Kidd, 1953; Narta et al., 2007).

À época dos estudos de Kidd, Karnofsky se encarregou de calcular a quantidade de soro de porquinhos da Índia necessária para tratar um paciente com leucemia e estimou que seriam entre 2 e 6 litros diários (Clarkson et al., 1970). A dificuldade de extrair grandes quantidades de soro de porquinho da Índia levou à busca de novas fontes de produção de L-asparaginase. Foi então que Mashburn e Wriston, em 1964, consideraram a possibilidade de produção

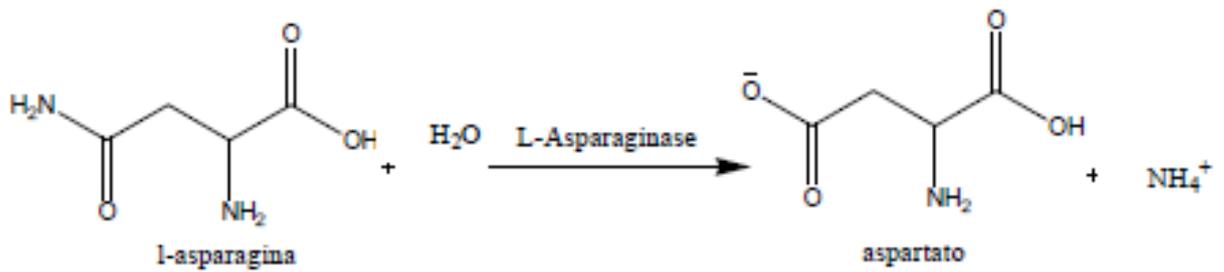
biotecnológica da L-asparaginase. Esta produção foi realizada por cultivo da bactéria *Escherichia coli* e isolamento da enzima (Müller e Boos, 1998). Em 1967, aconteceram as primeiras demonstrações em humanos e aplicações terapêuticas da ASNase derivada da *E. coli* (Narta, Kanwar e Azmi, 2007). A partir de então, constantemente a L-asparaginase tem sido uma enzima em estudo. A Figura 1 ilustra um esboço do histórico de uso da L-asparaginase como medicamento para o tratamento da LLA, desde a observação da sua atividade antineoplásica, por Kidd, até as aprovações pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA) dos diferentes tipos de L-asparaginase comercializados.



**Figura 1.** Linha do tempo do uso da L-asparaginase no tratamento da LLA (Torres-Obreque, 2017).

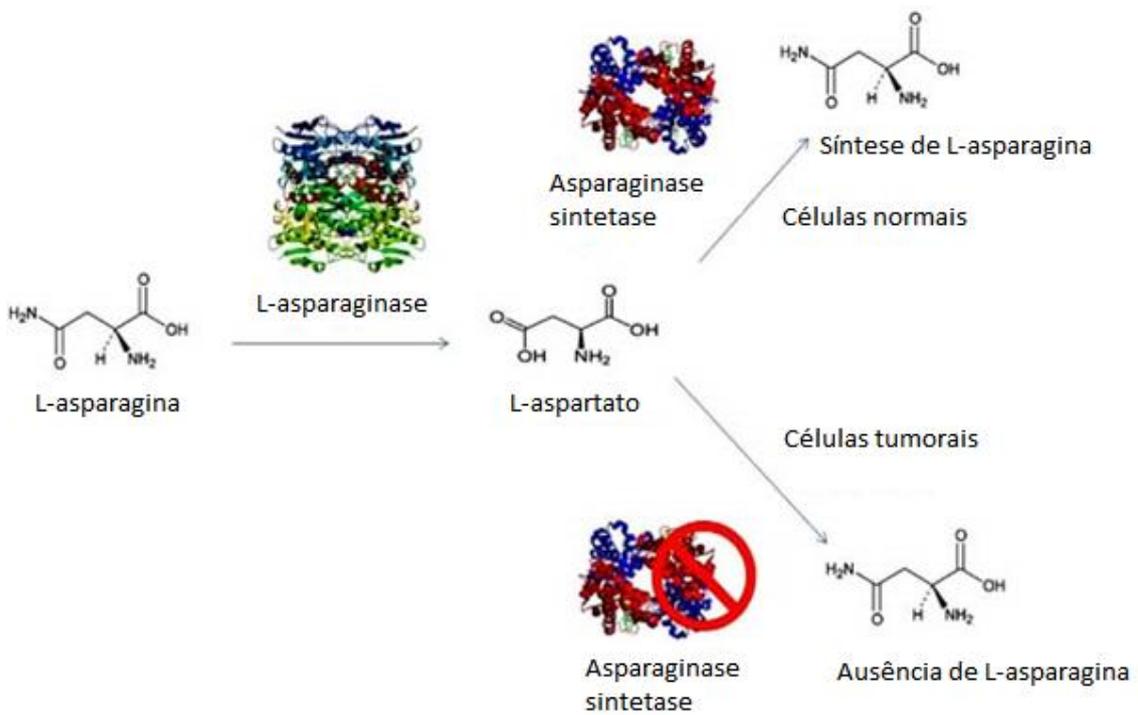
A ação da L-asparaginase no combate às células tumorais da LLA se deve ao fato de que, diferentemente das células normais, este tipo de células tumorais depende majoritariamente da disponibilidade externa do aminoácido L-Asparagina, ou seja, disponível na corrente sanguínea do aminoácido L-Asparagina, uma vez que são incapazes de produzir a enzima asparagina sintetase e, conseqüentemente, o aminoácido L-Asparagina. Desta forma, as células tumorais dependem exclusivamente do consumo externo do aminoácido asparagina para dar continuidade ao seu ciclo de vida (Avramis, 2012; Divino, 2015).

O mecanismo bioquímico da L-asparaginase consiste em converter o aminoácido L-Asparagina em aspartato e em amônia, como mostra a Figura 2, reduzindo a sua concentração na corrente sanguínea e diminuindo, portanto, a sua disponibilidade às células leucêmicas, levando ao comprometimento da síntese de proteínas construtivas e de proteínas regulatórias das células cancerosas que causam a LLA (Divino, 2015).



**Figura 2.** Conversão da L-asparagina em aspartato por ação enzimática da L-asparaginase (Divino, 2015).

A Figura 3 ilustra, mais especificamente, o mecanismo de ação da L-asparaginase como agente quimioterápico, conforme previamente exposto, demonstrando a ação da enzima em referência na hidrólise do aminoácido L-Asparagina e, conseqüentemente, na sua eliminação da corrente sanguínea e, portanto, no combate à LLA.



**Figura 3.** Mecanismo de ação da ASNase como agente quimioterápico. Adaptado de Azmi et al., 2017.

O uso da L-asparaginase apresenta, no entanto, inconvenientes relacionados sobretudo à imunogenicidade, à baixa meia vida, à afinidade entre a enzima e seu substrato e, ainda, à atividade glutaminásica (Ali et al., 2016; Avramis, 2012; Nagarethinam et al., 2012). Há outros

riscos associados ao uso de L-asparaginase, como pancreatite, maior probabilidade de infarto do miocárdio e disfunções hepáticas (Avramis, 2012).

A imunogenicidade se refere ao fato de a L-asparaginase ser uma molécula grande, com massa molecular estimada entre 136 e 140 kDa, o que permite o reconhecimento da enzima pelo sistema imunológico como um agente exógeno, levando à produção de anticorpos anti-ASNase. A meia-vida, por sua vez, consiste no tempo médio em que a molécula se mantém na corrente sanguínea, sem que seja degradada e de modo que mantenha a sua atividade (Torres-Obreque, 2017).

A L-asparaginase nativa produzida por *E. coli* foi a primeira a ser utilizada como biofármaco e ainda é a mais amplamente aplicada e explorada, sobretudo nos países mais pobres, por ser mais barata e apresentar maior viabilidade de produção e de uso.

A produção e engenharia de proteínas e enzimas são os principais responsáveis pelos novos *biobetters* de L-asparaginase, incluindo características aprimoradas, como atividade de glutaminase reduzida ou eliminada, resistência a proteases, estabilidade em geral e baixa imunogenicidade. Embora ainda não esteja disponível um novo *biobetter* de L-asparaginase que inclua todas as características desejáveis, muitos processos foram desenvolvidos com o objetivo de alcançar novas possibilidades de *biobetters* de L-asparaginase e, inclusive, já existem *biobetters* como a Oncaspar® (Brumano et al., 2019).

Embora várias maneiras de produzir a L-asparaginase tenham sido encontradas, apenas a forma nativa proveniente da *E. coli* e da *E. chrysanthemi* ganharam notoriedade e importância clínica e industrial, passando a ser oficialmente adotadas pelos protocolos internacionais de tratamento da LLA. Mais tarde surgiu a forma PEGuilada da enzima da *E. coli*, também amplamente aceita no mercado (Pieters et al., 2011).

Atualmente, são opções comerciais para o tratamento da LLA:

- L-asparaginase nativa de *E. coli* (no Brasil, é utilizado o medicamento conhecido como Leuginase®);
- L-asparaginase de *E. coli* PEGuilada, ou seja, a PEG-L-asparaginase (comercialmente conhecida como Oncaspar®); e
- L-asparaginase produzida a partir da *Erwinia chrysanthemi* (comercialmente conhecida como Erwinase®).

Em 2019 a ANVISA liberou, também, uma outra opção de L-Asparaginase: a Spectrila®.

Estas três opções do biofármaco têm suas escolhas definidas de acordo com cada país, inclusive em relação às suas recomendações de uso, isto é, quando cada uma delas é utilizada como primeira ou segunda linha nos protocolos de tratamento de adultos e de crianças. A Tabela 1 mostra quais são os protocolos adotados em cada região para o tratamento da LLA, indicando quais são os biofármacos indicados para pacientes de diferentes faixas etárias.

**Tabela 1.** Protocolo de tratamento de LLA no mundo. Adaptado de (Pieters et al., 2011).

<b>Faixa etária</b>	<b>Opção Tratamento</b>	<b>América do Norte, Reino Unido, Austrália e Nova Zelândia</b>	<b>Europa</b>	<b>Demais países</b>
Crianças	Primeira linha	PEG-asparaginase	<i>E. coli</i> asparaginase	<i>E. coli</i> asparaginase
	Segunda linha	Erwinia asparaginase	Erwinia asparaginase ou PEG-asparaginase	Erwinia asparaginase ou PEG-asparaginase
Adultos	Primeira linha	<i>E. coli</i> asparaginase ou PEG-asparaginase	<i>E. coli</i> asparaginase ou PEG-asparaginase	<i>E. coli</i> asparaginase
	Segunda linha	Erwinia asparaginase ou PEG-asparaginase	Erwinia asparaginase	Erwinia asparaginase ou PEG-asparaginase

A L-asparaginase nativa produzida por *E. coli* e PEGuilada, a PEG-asparaginase, apresenta menor imunogenicidade em função da ligação covalente da enzima com o monometóxi polietileno glicol, a qual reduz o reconhecimento da molécula pelo sistema imunológico (Narta, Kanwar e Azmi, 2007).

Entretanto, há a possibilidade de os anticorpos anti-ASNase reconhecerem a PEG-asparaginase e manter o efeito alergênico do medicamento em alguns pacientes. A estes pacientes, é recomendada a administração da L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* que, no Brasil, é utilizada como terceira opção na escolha do medicamento quimioterápico a ser adotado no tratamento da LLA (Pieters et al., 2011). Alguns países, entretanto, a adotam como segunda linha de tratamento, evitando as chances de exposição do paciente à imunogenicidade gerada pela exposição ao mesmo grupo de L-asparaginase (Pui, Liu e Relling, 2018).

Segundo Pieters (2011), 60% dos pacientes que receberam tratamento compreendendo L-asparaginase nativa apresentaram hipersensibilidade, estimulando a produção de anticorpos anti-ASNase, os quais levam a enzima à rápida inativação na corrente sanguínea.

A enzima PEGuilada, em relação à enzima sem modificações, apresenta maior meia-vida plasmática, o que diminui o número de doses necessárias ao paciente. Além disso, a versão PEGuilada também provoca expressiva queda de anticorpos presentes no organismo do paciente em função de sua menor imunogenicidade. Como desvantagem, a PEG-asparaginase apresenta menor afinidade (ou seja, maior valor de  $k_M$ ) ao substrato e, portanto, menor atividade enzimática (Torres-Obreque, 2017).

A Tabela 2 mostra as principais características dos principais biofármacos de L-asparaginase *in vivo*, evidenciando a maior meia-vida da versão PEGuilada, em relação às demais, assim como a sua menor imunogenicidade.

**Tabela 2.** Características dos principais biofármacos de L-asparaginase *in vivo* (OBREQUE, 2017).

<b>Característica</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>E. chrysanthemi</i></b>	<b>PEG-Asparaginase</b>
<b>Meia-vida</b>	1,28 dia IM* 0,76 dia IV**	0,65 dia IM* 0,31 dia IV**	5,73 dias IM*
<b>Presença de anticorpos nos pacientes</b>	45-75%	30-50%	5-18%
<b>Afinidade ao substrato (<math>k_M</math>)</b>	12,5-15,0 $\mu M$	48,0 $\mu M$	70,0 $\mu M$
<b>Tratamento</b>	1 dose de 6000 UI/m <sup>2</sup> a cada 48h (15 doses no total)	3 doses semanais de 2500 UI/m <sup>2</sup> por duas semanas (6 doses)	1 dose de 2500 UI/m <sup>2</sup> a cada duas semanas (3 doses)

\*IM: intra-muscular; \*\*IV: intra-venoso.

Por outro lado, a L-asparaginase nativa de *E. coli* é a opção que apresenta maior afinidade ao substrato, embora requeira maiores dosagens e atenções com efeitos alergênicos. Cada uma das opções, quando comparadas, apresenta vantagens e desvantagens, que são devidamente analisadas e levadas em consideração pelos protocolos de tratamento e de acordo com as respostas dos pacientes (Torres-Obreque, 2017).

São considerados para a seleção do tipo de biofármaco a ser utilizado no tratamento da LLA os custos associados ao uso de cada um dos medicamentos – que possui influência direta do bioprocessamento industrial e de fatores que serão explorados a seguir –, uma vez que doses de versões PEGuiladas da L-asparaginase apresentam, geralmente, maiores custos.

Estimam-se que pacientes que apresentam efeitos alérgicos à versão nativa da L-asparaginase podem ter seu custo de tratamento elevado em mais de 100% (Kurre et al., 2002; Tong et al., 2013).

Segundo publicações da Câmara dos Deputados e consultas em bases de dados compreendendo os preços dos biofármacos em referência, a Tabela 3 reúne os valores aproximados de venda das opções de L-asparaginase mais amplamente presentes no mercado brasileiro (Câmara dos Deputados, 2017).

**Tabela 3.** Preços disponíveis por uma unidade de biofármacos de L-asparaginase (Câmara dos Deputados, 2017).

<b>Biofármaco</b>	<b>Preço Unitário</b>	<b>Empresa/ Fornecedor</b>	<b>Custo estimado do tratamento*</b>
<b>Oncaspar<sup>®</sup></b>	USD 1,619.10	Sigma- Tau/Baxter	USD 4,857.30
<b>Leuginase<sup>®</sup></b>	USD 38	Beijing/Xetley	USD 570
<b>Erwinase<sup>®</sup></b>	USD 4,210.10	Porton Biopharm	USD 25,260.60
<b>Spectrila<sup>®</sup></b>	USD 582,17	Medac/Bagó	---

\*valores calculados com base nos dados das Tabelas 1 e 2.

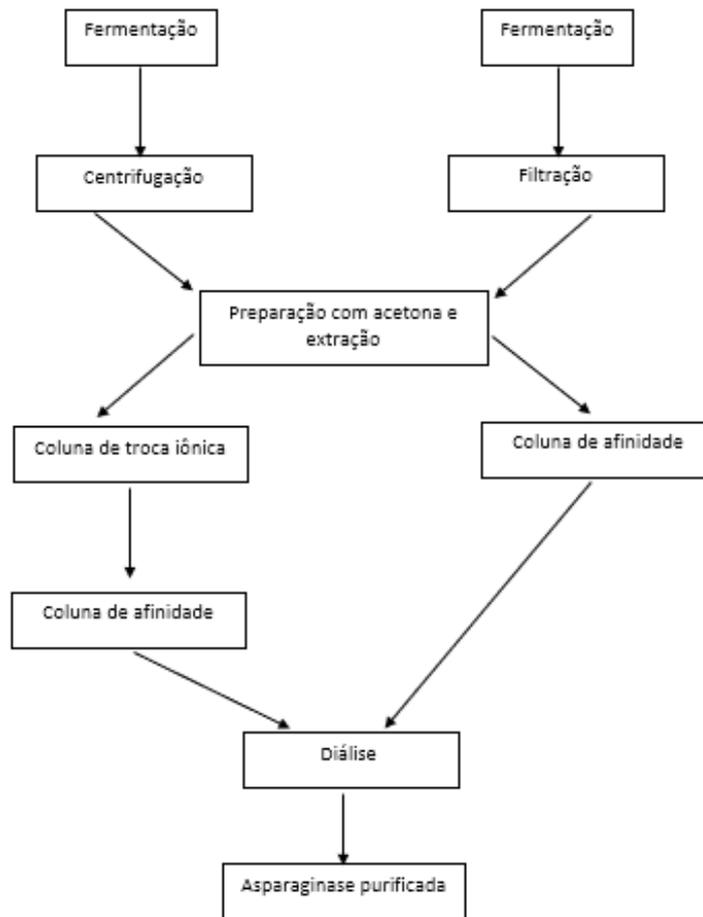
Como pode ser observado na Tabela 3, os biofármacos com mais tecnologia incorporada, como a PEG-asparaginase (Oncaspar<sup>®</sup>) e a Erwinase<sup>®</sup>, que ainda se vale de proteção por patente em vigor, possuem maiores valores agregados e, portanto, são mais custosos. Embora suas quantidades de doses sejam menores, o que com certeza leva a diversos benefícios ao paciente, os seus valores de tratamento estimados ainda são considerados bastante superiores à Leuginase<sup>®</sup>, quando considerado apenas o valor com medicamentos.

É evidente que o uso da L-asparaginase, tal como hoje, requereu o desenvolvimento de moléculas eficientes e de respectivos bioprocessos industrialmente viáveis, tanto do ponto de vista técnico quanto do ponto de vista econômico. Os esforços de pesquisa, como comumente acontece com os biofármacos, requerem longos períodos de tempo de estudos, desenvolvimento e testes, além de montantes consideráveis de capitais.

Assim, a viabilidade de produção de um biofármaco é um importante e fundamental fator para o início da fabricação e uso de determinado biofármaco. Naturalmente, após todos os desenvolvimentos laboratoriais, testes e etapas de controle e comprovação de qualidade, é preciso verificar se o biofármaco é viável de ser produzido e se seu custo de produção é interessante para seus produtores.

As desvantagens associadas às moléculas conhecidas e utilizadas de L-asparaginase, a necessidade de novas formas de produção mais viáveis técnica e economicamente e o desenvolvimento de processos e moléculas que possam ser produzidos sem interferência de produtos e processos já protegidos por patentes, por exemplo, são motivadores de pesquisa e inovação sobre biofármacos de L-asparaginase.

A Erwinase – o biofármaco de L-asparaginase mais recentemente lançado no mercado –, por exemplo, tem seu processo de produção protegido pela patente não mais válida estadunidense US4,729,957, cuja titularidade é da empresa norte-americana US Health. A Figura 4 ilustra, por meio de um diagrama de blocos, as etapas e sequências para a produção de Erwinase de acordo com o processo de produção protegido pela patente em referência.



**Figura 4.** Fluxograma geral do processo de produção da L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®) –Adaptado da patente US 4,729,957.

O processo de produção protegido pela patente era caracterizado por compreender as seguintes etapas: seleção das células; permeabilização da *E. chrysanthemi* misturando-a com acetona e passando a mistura de acetona/célula através de um filtro prensa duas vezes; lavagem do bolo de acetona/célula com solução tampão na faixa de pH neutro (pH 6,5-7,5) para remover a acetona; lavagem das células com tampão em escala alcalina; passagem das células através de uma prensa celular para extrair a enzima; clarificação do fluido contendo enzima por passagem em linha através de um saco de filtro carregado com removedor de resíduos de células e purificação da enzima em colunas cromatográficas e diálise.

Novas alternativas de biofármacos de L-asparaginase são estudadas e desenvolvidas em âmbito nacional, a fim de prover novas opções de tais biofármacos, visando à produção com tecnologia nacional (Pessoa-Junior et al., 2014).

### **3.2. A produção de biofármacos – panorama de produção e mercado**

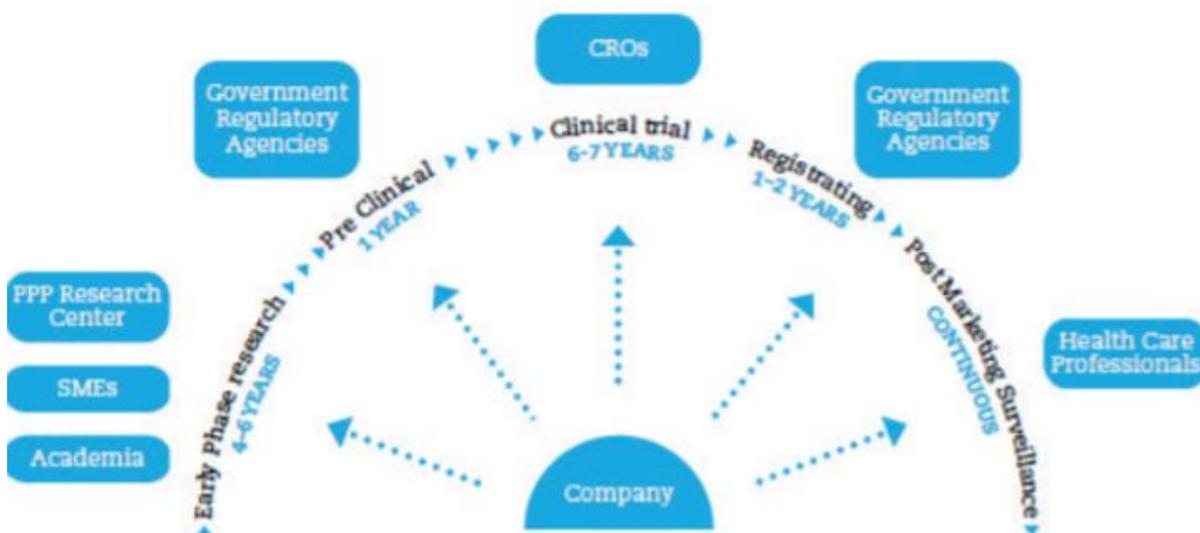
Biofármacos são medicamentos biológicos produzidos por técnicas de biotecnologia e na presença de um sistema biológico vivo, podendo ser desenvolvidos por meio de órgãos, tecidos, micro-organismos ou suas partes, fluidos animais ou também células e organismos modificados. Os biofármacos são proteínas de maior complexibilidade e geralmente são susceptíveis à desnaturação e os processos de produção são, em geral, mais complexos em relação às vias químicas tradicionais (Brandão e Souza, 2015).

A elaboração e o desenvolvimento de biofármacos de origem microbiana começam com a escolha do sistema biológico a ser utilizado como agente produtor da proteína de interesse, o que pode ser denominada como etapa de bioprospecção. Após esta fase, o sistema biológico selecionado é induzido ao crescimento em meio de cultura adequado, o qual também é previamente selecionado e escolhido, de acordo com as necessidades nutricionais da célula utilizada no processo (Schmidell et al., 2001).

Geralmente faz parte do processo de desenvolvimento de um biofármaco a modificação genética de células, em geral, sendo mais comum os micro-organismos, que, ao receberem o material genético da célula capaz de produzir a proteína de interesse, passam a conter as informações genéticas necessárias para sintetizar a biomolécula que se objetiva obter. Neste caso, estas células modificadas são cultivadas, em diferentes escalas (laboratório; piloto e industrial) e, sob as condições físico-químicas adequadas passam a produzir a proteína de interesse e então posteriormente, passa por purificação, estabilização da molécula, formulação e, antes da fase comercial, passa também por ensaios clínicos para o tratamento terapêutico desejado (Benavide, 2013).

As primeiras proteínas de interesse terapêutico produzidas por organismos recombinantes ficaram conhecidas como biofármacos de primeira geração e consistem, basicamente, em medicamentos cujos princípios ativos são proteínas idênticas às existentes na natureza. Avanços tecnológicos e da engenharia genética levaram ao desenvolvimento de moléculas conhecidas como biofármacos de segunda geração, os quais são cópias ou análogos às moléculas de primeira geração e apresentam alterações em suas propriedades, como maior atividade biológica, estabilidade, ação mais rápida ou mais lenta. Existe também uma terceira geração de biofármacos, referente aos anticorpos monoclonais e a proteínas de fusão (Carreira et al., 2013).

A Figura 5 ilustra as etapas envolvidas na produção de um biofármaco, desde a sua idealização até o seu lançamento no mercado, evidenciando o longo período de tempo entre idealização-lançamento envolvido e a complexidade compreendida na criação de novos biofármacos.



**Figura 5.** Cadeia de desenvolvimento de um biofármaco, desde a fase de desenvolvimento inicial (acadêmico) até a sua disponibilização ao mercado, passando por todas as fases mais comuns e mandatórias de um processo de desenvolvimento e lançamento de um biofármaco.

Fonte: INTERNATIONAL FEDERATION OF PHARMACEUTICAL MANUFACTURES & ASSOCIATIONS, em IPEA, 2018.

Os avanços da tecnologia de DNA recombinante e da engenharia genética foram fatores que alavancaram o desenvolvimento dos biofármacos, permitindo produção segura de medicamentos com maior eficiência. Embora os biofármacos enfrentem dificuldades em suas aprovações e, geralmente, tenham maior custo, este setor ainda assim cresce significativamente, assim como a sua importância. Isto porque os biofármacos são responsáveis pelos tratamentos de doenças como Alzheimer, câncer, apneia do sono, artrite reumatoide, ataques cardíacos, diversos tipos de câncer, dentre diversas outras doenças (Carreira et al., 2013).

Assim, o mercado de biofármacos apresenta expressivo crescimento com diferentes tipos de produtos, como mostra a Figura 6, que mostra o avanço de mercado de diversos tipos de biofármacos, em escala global, de 2003 a 2018.

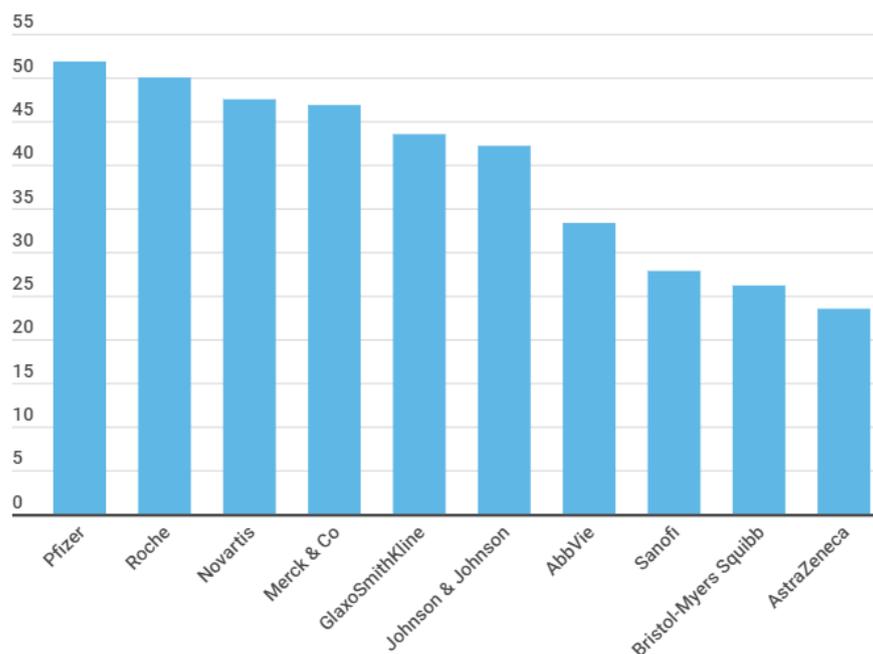
Evolução do mercado global de biofármacos - de 2003 a 2018					
Rank 2018	Droga	2003 (\$m)	2008 (\$m)	2013 (\$m)	2018 (\$m)
1	Vacinas	7,318	17,088	21,946	28,731
2	Insulina/análogos	6,282	13,732	24,877	26,894
3	Humira	280	4,521	10,659	19,936
4	Enbrel	1,599	6,445	8,790	9,034
5	Keytruda	0	0	0	7,171
6	Herceptin	876	4,680	6,558	7,132
7	Avastin	0	4,785	6,746	6,996
8	Rituxan/MabThera	2,065	5,443	7,498	6,897
9	Obdivo	0	0	0	6,735
10	Hormônio de crescimento humano	2,431	4,658	5,646	5,562
<b>Total de biofármacos</b>		<b>49,472</b>	<b>110,757</b>	<b>159,977</b>	<b>218,687</b>
% mercado global de Rx		9.0%	16.8%	20.5%	25.3%

**Figura 6.** Tabela representativa da evolução do mercado global de biofármacos, entre o período de 2003 a 2018. Adaptado de Hall, Hill e Pavé, 2019.

A produção de biofármacos é concentrada, em sua maioria, nos Estados Unidos – onde recebe notável destaque –, na Europa e no Japão. No entanto, a Ásia está apresentando expressivos crescimentos na área, sendo representada principalmente pela China e pela Índia (Fardelone e Branchi, 2007).

Mundialmente, as indústrias farmacêuticas têm se voltado e apostado na produção de biofármacos, que, nos últimos anos, representou aproximadamente 20% do mercado da indústria do setor farmacêutico, chegando a superar, em 2016, 250 bilhões de dólares em vendas globais (Salerno, Matsumoto e Ferraz, 2018).

A Figura 7 ilustra um gráfico com a classificação das dez empresas líderes em mercado em relação a seus faturamentos com biofármacos durante o ano de 2019, em todo o mundo.



**Figura 7.** Representação gráfica do faturamento (em milhões de dólares) em produtos biotecnológicos em 2019 pelas 10 maiores empresas da área (Lindsley, 2018).

As crescentes pesquisas e o grande volume de investimentos voltados à produção de biofármacos refletem em importantes avanços científicos na área e ao progressivo aumento do mercado de biofármacos no mundo. Ainda, o fim da vigência de patentes possibilita a produção de biossimilares e a exploração da substância e/ou do processo a fim de desenvolverem melhorias e aprimorarem produtos já existentes (Peres, Padilha e Quental, 2012).

Empresas desenvolvedoras de tecnologias e de novos biofármacos são detentoras de grandes investimentos, mas o mercado de pesquisa e desenvolvimento de biofármacos também vem sendo fortemente concentrado em pequenas e médias empresas, por exemplo, em *startups*. Neste sentido, os biossimilares compõem uma oportunidade para o desenvolvimento do mercado de menor porte em países em que a produção do setor é escassa, como o Brasil (Tanaka e Amorim, 2014). O desenvolvimento de um biossimilar, entretanto, não é simples e enfrenta diversos obstáculos regulatórios para a sua aprovação.

Segundo o relatório de Salerno de 2018, “enquanto os genéricos são produtos idênticos aos originais, no caso dos biossimilares, isso dificilmente é alcançado, sendo, como o próprio nome diz, similares. Outra questão é que esses biomedicamentos, mesmo sem os altos custos das fases de desenvolvimento, necessitam de grande capital para criação de instalação de

produção, além de se exigir mão de obra especializada para controlar e gerenciar os processos. Isto se deve à complexidade da manipulação de micro-organismos”.

A produção biotecnológica no Brasil, que inclui biofármacos, é consideravelmente menos expressiva em relação a de diversos outros países e a demanda destes produtos no país é suprida por importação na maior parte das vezes. Em 2016, o Brasil dispunha de um total de 214 indústrias farmacêuticas, sendo a maior parte delas voltadas às produções de produtos genéricos e similares. Deste total, 63 empresas já apresentavam participação nas vendas de medicamentos biológicos, sendo que os produtos biológicos representaram 19% do faturamento total de medicamentos no Brasil, embora, quantitativamente, os biofármacos tenham representado menos de 5% do total de unidades de medicamentos vendidas (Salerno, Matsumoto e Ferraz, 2018).

De acordo com Madeira (2013),

A produção desses biofármacos no Brasil é de suma importância em vários aspectos, tal como o aumento do parque industrial brasileiro no mercado biotecnológico, a ampliação do espectro de tratamento medicamentoso, além da especialização de recursos humanos nessa área tecnológica. Assim, obtenção de informações referentes aos biofármacos e a avaliação do mercado tecnológico, mundial e nacional, são etapas fundamentais na identificação de oportunidades para a produção no Brasil, podendo ser um alicerce para obtenção de maiores benefícios econômicos e sociais para o país.

Em contrapartida, a biotecnologia está presente em muitas universidades e centros de pesquisas brasileiros, sendo as mais constantes pesquisas da biotecnologia nacional os biofármacos, os imunobiológicos (incluindo vacinas), os reagentes biológicos para diagnósticos e os hemoderivados (Tanaka e Amorim, 2014).

Estima-se que a produção de biofármacos no Brasil poderia gerar uma economia de até 400 milhões de reais por ano e muitos pesquisadores acreditam que impulsionar o desenvolvimento nacional deste setor é crucial para a continuidade do desenvolvimento tecnológico e social nacional (Tanaka e Amorim, 2014).

Levando-se em consideração este cenário, o governo foi responsável pelo lançamento de programas que objetivam o desenvolvimento do setor biotecnológico nacional, como é o caso do Programa de Biotecnologia e Recursos Genéticos e do Projeto Genoma, ambos de 2000,

que receberam investimentos do Ministério da Ciência e da tecnologia, além do CNPq, da FAPESP e da FINEP. Diversos outros programas de fomento ao desenvolvimento biotecnológico foram lançados pelo governo, a exemplo do Programa Inovar, voltado a reunir capital de risco a pequenas e médias empresas de base tecnológica, e o Programa de Capacitação de Empresas de Base Tecnológica, do BNDES, o qual, desde 2000, já destinou cerca de 45 milhões de dólares a setores como telecomunicação, ecologia, eletrônica e biotecnologia que, por sua vez, recebeu 11,5% deste total (Tanaka e Amorim, 2014). Mais recentemente, o Plano Brasil Maior (PBM), lançado em 2010, instituiu uma política industrial, voltada à produção de biofármacos, além de equipamentos e de instrumentos médicos (Urti, Soares e Vargas, 2019).

Além destes programas, a Lei da Propriedade Industrial, que inclui as patentes, a Lei de Proteção aos Cultivares, a Lei nº 8.974, que dispõe sobre a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, e a Lei de Acesso aos Recursos Naturais também são iniciativas que visam ao favorecimento do desenvolvimento biotecnológico nacional.

Vários fatores e prerrogativas estão envolvidos no avanço da indústria biotecnológica do Brasil. Dentre tais fatores, o desenvolvimento de laboratórios nacionais biotecnológicos é essencial para a competitividade a médio e longo prazos no Brasil e para reduzir os gastos com produtos biológicos importados. Assim, a fim de desenvolver um parque industrial biotecnológico no Brasil, há importantes iniciativas governamentais das quais a produção de produtos biotecnológicos nacionais poderia se valer, como por exemplo:

- a) Lei 12.349/2010, que regulamenta as compras públicas e estabelece preferência, em licitações, para produtos produzidos nacionalmente;
- b) Portaria 1.284 do Ministério da Saúde, de 26 de maio de 2010, que inclui os produtos biológicos na lista de produtos prioritários a serem produzidos nacionalmente;
- c) Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP), que consistem em parcerias estabelecidas entre laboratórios públicos brasileiros e laboratórios privados para a transferência de tecnologia e produção local de medicamentos (Scheinberg et al., 2018); e
- d) Portaria do Ministério da Saúde nº 897, de 18 de abril de 2016, que determina, entre vários objetivos, que seja priorizada a fabricação de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS) que sejam de alto custo e de alto impacto social.

Dentre os produtos com maior atratividade e com maior concentração de investimentos e projetos estão os medicamentos oncológicos, que possuem alto valor agregado, e, portanto, recebem a atenção das indústrias farmacêuticas. Neste sentido, em 2013, foram estabelecidas

novas parcerias PDP, que, inclusive, foram atualizadas em nova portaria em 2014. Com uma produção nacional dos medicamentos abrangidos pelo PDP, estimasse que o Ministério da Saúde pudesse obter uma economia de 50% do seu orçamento anual para medicamentos, uma vez que tal percentual se refere aos medicamentos foco da PDP.

A Figura 8 apresenta as PDPs voltadas a produtos biológicos que foram estabelecidas, seus produtos de interesse e os parceiros público e privado envolvidos em cada uma das parcerias.

**QUADRO 1**  
**Novas PDPs em biológicos**

<b>Indicação</b>	<b>Produto</b>	<b>Parceiros Públicos</b>	<b>Parceiros Privados</b>
Oncológico	Trastuzumabe	Bahiafarma Biomanguinhos IVB	Libbs, Mabxience Orygen,Alteogen PharmaPraxis
	Cetuximabe	IVB,Biomanguinhos Butantan	Bionovis Libbs, Mabxience
	L-asparaginase	Fiocruz	NT Pharma United Biotec
	Filgrastima	Biomanguinhos	Eurofarma
Oncológico/Artrite Reumatóide	Rituximabe	IVB, Biomanguinhos Butantan	Bionovis Libbs, Mabxience
Artrite Reumatóide	Adalimumabe	Biomanguinhos IVB Bahiafarma	Orygen,Alteogen PharmaPraxis Libbs, Mabxience
	Certolizumabe	Biomanguinhos	UCB Pharma, Meizler
	Etanercepte	IVB, Biomanguinhos Butantan Bahiafarma	Bionovis Libbs, Mabxience Orygen,Alteogen
	Infliximabe	IVB, Biomanguinhos	Bionovis
Diabetes	Insulina	Farmanguinhos Farmanguinhos	Biommm Indar
Hormônio do Crescimento	Somatropina	Biomanguinhos Funed	Cristália Pfizer
ONCOLÓGICO/Degeneração Macular Relacionada à Idade	Bevacizumabe	Tecpar Butantan Biomanguinhos IVB	Biocad Libbs, Mabxience Orygen,Alteogen Bionovis
Cicatrizante	Cola fibrina	Hemobrás, IBMP	Cristália
Imunoterapia	Vacina Alergênica	Bahiafarma	Biocen, Salundinvest
<b>TOTAL</b>		<b>8</b>	<b>17</b>

Fonte: Agência Saúde.

Obs.: Quadro reproduzido em baixa resolução e cujos leiaute e textos não puderam ser padronizados e revisados em virtude das condições técnicas dos originais (nota do Editorial).

**Figura 8.** Relação de medicamentos biológicos para produção no Brasil por meio de PDPs estabelecidas (Salerno, Matsumoto e Ferraz, 2018).

Em relação à L-asparaginase, que consta na lista de produtos a terem a produção nacional desenvolvida, sua obtenção era realizada por meio de importações do biofármaco comercialmente conhecido como Elspar<sup>®</sup> até o ano de 2013, quando o laboratório Bagó encerrou suas atividades no Brasil e, então a enzima foi inserida no projeto de desenvolvimento nacional. Entretanto, até o momento não foi iniciada a produção nacional da L-asparaginase, logo, o Brasil permanece refém e dependente do mercado externo para suprir as demandas nacionais do medicamento.

Em 2017 a L-asparaginase foi veiculada na imprensa por conta da troca de fornecedor do qual o Ministério da Saúde adquiria o medicamento. Isto porque, desde 2013, o medicamento que vinha sendo comprado pelo Governo, a Aginasa<sup>®</sup>, era produzido pelo laboratório alemão Medac/Kyowa e, em 2017, o Ministério da Saúde passou a adquirir a L-asparaginase produzida pelo laboratório chinês Beijing SL Pharmaceutical e comercializada sob o nome Leuginase<sup>®</sup> (Câmara dos Deputados, 2017). A troca de fornecedores levantou uma polêmica em relação à qualidade e ao cumprimento dos requisitos determinados para a enzima. Frente à repercussão, o Instituto Butantan e o Laboratório LNBio (Laboratório Nacional de Biociências) de Campinas realizaram estudos comparativos entre os dois medicamentos, a fim de verificar a qualidade do novo biofármaco adquirido (Zenatti et al., 2018). Os estudos realizados revelaram que a L-asparaginase chinesa possui mais impurezas em relação à alemã. Entretanto, ambas as enzimas apresentaram similares atividades enzimáticas *in vitro*, embora a Leuginase<sup>®</sup> tenha resultado em atividade plasmática três vezes inferior em relação à Aginasa<sup>®</sup>. Ainda, constatou-se que, em ratos, a Leuginase<sup>®</sup> levou ao desenvolvimento de maiores quantidades de anticorpos anti-asparaginase (Zenatti et al., 2018).

De toda forma, os custos de importação do Ministério da Saúde poderiam ser reduzidos e o país não precisaria ser dependente da importação do biofármaco caso alguma das possibilidades de processos de produção de biofármacos de L-asparaginase fosse colocada em prática, haja vista a ampla quantidade de pesquisas sobre a produção de L-asparaginase desenvolvida por universidades brasileiras.

### **3.3. ANÁLISES TÉCNICO-ECONÔMICAS DE BIOPROCESSOS**

As análises técnico-econômicas são ferramentas fundamentais para avaliar processos industriais, isto porque seus resultados e parâmetros permitem que sejam identificadas restrições, gargalos e, portanto, as etapas e operações que, se otimizadas, melhorariam o

desenvolvimento do processo sob diferentes pontos de vista, direcionando os esforços de estudo, de pesquisa e de desenvolvimento para aquelas etapas e/ou fatores que realmente merecem e requerem a devida atenção (Farid, 2006).

Pelo fato de serem ferramentas essenciais para avaliar as possibilidades de realização e implementação de um processo industrial, as análises técnico-econômicas têm sido utilizadas por diversos ramos industriais, desde as plantas mecânicas até as biofarmacêuticas.

Os bioprocessos têm recebido mais atenção e tornaram-se mais comuns, dada à diversificação da aplicação na produção de produtos de alto valor, como os biofármacos voltados aos tratamentos de doenças importantes e apresentando bons resultados. A quantidade de estudos e projetos biotecnológicos apresentou vertiginoso aumento, assim como suas plantas industriais, requisitando o desenvolvimento de muitas novas tecnologias e estudos sobre bioprocessos e bioengenharia focados em biofármacos, vacinas, cosméticos e indústrias de alimentos, por exemplo (Petrides et al., 2002; Salerno et al., 2018).

Assim, para que possa ser avaliada a possibilidade de realização de um bioprocessos estudado, as ferramentas para avaliar a viabilidade técnico-econômica são de grande interesse das empresas em geral, uma vez que permitem avaliar e prever o impacto de diferentes variáveis do processo, de analisar a sua lucratividade e a sua possibilidade técnica de ser realizado, sendo indispensável para a triagem e o mapeamento do projeto e/ou seleção do melhor planejamento estratégico, tendo como base as informações obtidas pelas análises econômicas e técnicas preliminares (Farid, 2006; Nandi et al., 2016).

### **3.3.1 Simulação e Modelagem**

As simulações de processos industriais, em que os bioprocessos estão incluídos, tornaram-se fundamentais para realizar as análises de processos que já estão em operação e que estão ainda em fases de idealização e de projeto, guiando os esforços das pesquisas e dos desenvolvimentos, além de avaliar os impactos de variações dos parâmetros nos processos e no produto final.

A simulação e a modelagem de processos, em geral, são fundamentais para a análise, a projeção, o dimensionamento, a otimização de processos de produção, representando, em computador, um processo baseado em modelos matemáticos e de parâmetros e dados (Ferreira, Azzoni e Freitas, 2018). Para processos biotecnológicos, são definidos os parâmetros físicos, químicos e biológicos associados a cada operação individualmente, sendo cada uma das

operações ligadas e relacionadas entre si para formar o processo como um todo (Ferreira, Azzoni e Freitas, 2018).

O uso e o desenvolvimento de ferramentas de simulação para simular e avaliar processos industriais nasceram na indústria química e de petróleo nos anos 1960, que foram desenvolvidas para otimizar o *design* e a operação dos processos (Petrides et al., 2014; Toumi et al., 2010). Porém, o uso de tais simuladores focados na indústria química e petroquímica não era ideal para aplicação na indústria biotecnológica. Isto porque, conforme mostrado pela Figura 9, há diferenças significativas entre processos químicos e bioprocessos, sendo que tais diferenças, sensibilidades e restrições precisam ter uma abordagem diferencial e específica, que não poderia ser provida pelos primeiros programas de simulação desenvolvidos.

<b>Bioprocessos</b>	<b>Processos Químicos</b>
Decorrentes de atividade biológica	Decorrentes de reações químicas
Catalisadores de alta especificidade	Catalisadores não específicos
Condições brandas de T, P e pH	Condições drásticas de T, P e pH
Maiores volumes	Menores volumes
Podem requerer esterilidade	Não requerem esterilidade

**Figura 9.** Tabela comparativa entre características contrastantes entre processos químicos convencionais e bioprocessos (Pereira Jr., Bon e Ferrara, 2008).

A necessidade do desenvolvimento de ferramentas de simulações referentes a bioprocessos e biofarmacêuticos compreendendo recursos focados nas especificidades e particularidades deste tipo de processo – mais complexo e sensível - começaram a ser estudadas desde 1990, quando a Aspen Technology, Inc. (Cambridge, MA) introduziu o *Batch Plus*, um simulador baseado em processos farmacêuticos em batelada (Petrides et al., 2014).

Também podem ser citados como exemplos de ferramentas de simulação o SuperPro Design<sup>®</sup>, lançado pela Intelligen, Inc. (Scotch Plains, NJ), que foi iniciado no *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) no final dos anos 1980. Por volta da década de 1990, a Hyprotech, Ltd. (subsidiária da AEA Engineering Software) lançou o *Batch Design Kit* (BDK), uma ferramenta originalmente desenvolvida no MIT que é bastante semelhante ao *Batch Plus* (Nandi et al., 2016).

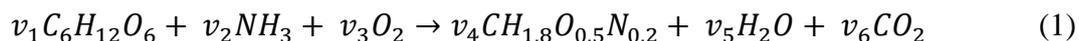
Genericamente, todos os softwares são dotados de modelos estáticos capazes de levar em conta os efeitos de fatores dinâmicos, como restrições de recursos e utilidades, como tempo, massa, pureza, demanda e parâmetros operacionais. A interação de múltiplos fatores também precisam ser levadas em consideração, uma vez que podem fornecer informações sobre as fraquezas de uma aplicação com as forças de outra (Stonier, 2010).

Neste contexto, para cada operação unitária, são adotados alguns modelos matemáticos que a representem e, por meio da alimentação de dados – retirados da literatura ou de meios experimentais –, criam uma base inicial do processo como um todo, permitindo, assim, as análises e avaliações de diversos parâmetros (Ferreira, Azzoni e Freitas, 2018).

A representação de um processo em simulador consiste, basicamente, na representação de operações unitárias, seleções dos respectivos equipamentos e alimentação de parâmetros, em geral. Os simuladores permitem, desta forma, elaborar fluxogramas de processo, que representam as plantas industriais de maneira moderna e interativa e devem, portanto, estar sujeitos a constantes atualizações e em contato direto com os trabalhos experimentais e com as avaliações de qualidade para que o processo possa ser otimizado e se tornar mais viável, gerando um produto atrativo, dos pontos de vista econômico, técnico, de qualidade e até mesmo ambiental.

A simulação de um bioprocessamento requer, primeiramente, uma estimativa da demanda de produção – geralmente anual. São também essenciais as propriedades de pureza do produto e o meio biológico de processo a ser adotado, assim como a sequência de operações, do *upstream* ao *downstream*, além dos materiais demandados pelo processo (Rouf et al., 2001).

A seção conhecida como *upstream* consiste nas etapas anteriores à purificação dos bioprodutos. Estas etapas são voltadas ao preparo do inóculo a ser utilizado na seção seguinte, de biorreação. Nesta fase ocorre a transformação biológica em biorreatores, que pode ser ou enzimática e sem a presença de células ou em uma cultura celular. Para simulação, é necessário fornecer ao *software* um modelo quantitativo da transformação biológica, revelando quantidades de substrato consumido e de produto gerado. Os simuladores geralmente aceitam tanto modelos estequiométricos como modelos cinéticos. Um exemplo de modelo estequiométrico para a representação do crescimento aeróbico da *E. coli* em meio compreendendo glicose e amônia pode ser observado na Equação 1 (Heinzle, Biwer e Cooney, 2006).



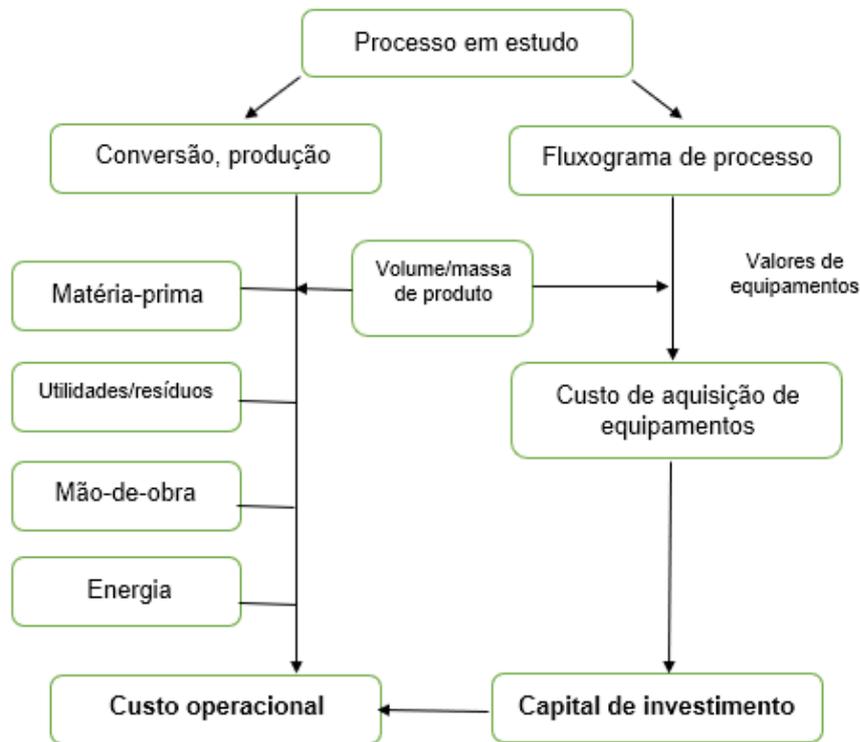
Após inserir no simulador as informações devidas (substrato, componentes, modelo), é preciso definir as etapas e os parâmetros da seção de *downstream*, que geralmente é a mais complicada, sobretudo em processos de produção de fármacos, que possuem rigorosos padrões de qualidade e chega a compor até 80% do custo total de produção (Hassan et al., 2015; Rouf et al., 2001). Nesta seção, as operações unitárias geralmente são selecionadas para, nesta ordem, remover as impurezas mais abundantes, as mais fáceis, simples e baratas, selecionando operações que sejam aptas a remover uma vasta variável de subprodutos e impurezas. Além disso, deve-se ter em vista o fato de o produto ser obtido intracelular, extracelular ou por processo enzimático.

Os modelos matemáticos utilizados na simulação de viabilidade técnica e econômica podem e geralmente são bem mais simples que os modelos de simulação de processos, isto se deve ao fato que o interesse destes modelos é obter dados de custo de processamento, sendo que, não há a necessidade do rigor de representar como o processo realmente ocorre, como é o caso de modelagem é simulação de processos no qual o interesse é entender o processo em si.

Conhecidas e selecionadas todas as operações unitárias e seus respectivos equipamentos, forma-se o fluxograma do processo, em simulador, com correntes indicando as entradas e saídas. Os parâmetros de cada uma das operações e das correntes são também inseridos no banco de dados da simulação do bioprocessos. Com base na taxa anual de produção e no tempo de funcionamento da planta, são estabelecidos os tamanhos dos equipamentos, as quantidades de cada um dos materiais necessários, consumo de utilidades (vapor, água, energia elétrica, etc), tamanho e o número de lotes e, até mesmo, a demanda por mão-de-obra.

### 3.3.2 Avaliação Econômica de Bioprocessos

A Figura 10 ilustra as etapas e dados principais necessários para a realização da simulação visando a obtenção de dados econômicos, que é baseada nos estudos de Heinzle (2006).



**Figura 10.** Etapas para a estimativa de capital de investimento e de custo operacional envolvidos em um processo de produção. Adaptado de Heinzle, Biwer e Cooney, 2006.

Como mostra a Figura 10, para a análise econômica, é mandatório que sejam levados em consideração os custos das matérias-primas, o tratamento dos efluentes, as utilidades, a operação, a mão-de-obra, a manutenção e reparos gerais e suprimentos (Mussatto et al., 2013, 2015; Petrides et al., 2002). Assim, a Tabela 4 apresenta os dados econômicos necessários e separados entre capital de investimento e custos operacionais. Ainda, a referida tabela mostra as fontes propostas para a aquisição dos dados necessários a serem alimentados no *software* a ser utilizado – no caso, o SuperPro Design®.

**Tabela 4.** Dados necessários e fontes de aquisição para análise econômica. Adaptado de Heinzle, Biwer e Cooney, 2006.

	<b>Dados necessários</b>	<b>Fontes para aquisição dos dados necessários</b>
<b>Capital de investimento</b>	Aquisição de equipamento	Fabricantes, literatura, atualização de preços antigos, biblioteca do SuperPro Design®
	Sistema de Tubulação	Valores estimados em percentual do custo de aquisição de equipamentos. Estas estimativas percentuais estão disponíveis na literatura
	Instrumentação	
	Sistemas elétricos	
	Instalação	
	Edificação	
	Engenharia	
	Construção	
<i>Start up</i> e validação		
Contingência		
<b>Custo operacional</b>	Matéria-prima	Fabricantes, literatura
	Mão-de-obra	Valores de mercado podem ser buscados
	Suprimentos operacionais	Valor estimado em percentual do custo de mão-de-obra; disponíveis na literatura
	Laboratório/QC/QA	Valor estimado em percentual do custo de mão-de-obra; disponíveis na literatura
	Utilidades	Literatura, preços publicados, atualização de preços antigos, biblioteca do SuperPro Design®
	Tratamento de resíduos/efluentes	Literatura
	Taxa de depreciação	Literatura
Tempo de depreciação	Literatura	

Para análises econômicas de processos químicos e de bioprocessos, duas classes principais de centros de custo são geralmente consideradas: **custos operacionais** (chamados de *Operating Expenditures* – OPEX) e **custos de capital fixo** (também conhecido como *Capital Expenditures* – CAPEX). Em geral, essas duas principais modalidades de custo podem ser separadas da seguinte maneira (Turton et al., 2018; Vazzoler, 2017):

Investimentos ou custos fixos (CAPEX): referem-se ao conjunto de custos associados a uma planta industrial anteriormente ao início de suas operações e funcionamento; e

Custos operacionais (OPEX): conjunto de custos que são repetidos e recorrentes, por todo período de tempo considerado – um ano, por exemplo, e essenciais para a operação de uma planta industrial.

O **CAPEX** é formado, como anteriormente explicado, como o grupo de custos envolvidos em uma planta industrial a ser montada antes do começo de sua operação. Dentro destes custos estão incluídos o **capital fixo direto**, que engloba os custos de aquisição de equipamentos e da instalação, além dos custos com as edificações, construção e engenharia. Fazem também parte deste grupo de custos aqueles custos relacionados à **pesquisa e desenvolvimento**, **royalties** (em caso de licenciamento de patentes de terceiros) e **validação e startup** da planta industrial e, ainda, o **capital de giro** para o funcionamento inicial da planta (Ferreira et al., 2018; Heinzle et al., 2006; Petrides et al., 2002; Turton et al., 2018; Vazzoler, 2017).

Os **OPEX**, por sua vez, são os custos intrínsecos à operação/realização de um processo, conforme disponível na Tabela 5, que lista os itens que compõem os custos operacionais, o tipo de custo – direto ou indireto – e a proporção de cada item na composição do custo operacional total (Heinzle et al., 2006; Petrides et al., 2002; Turton et al., 2018; Vazzoler, 2017).

Desta forma, é importante ressaltar que os valores apresentados na Tabela 5 são apenas estimativas da composição de cada um dos itens em relação ao custo total de operação. Assim, estes percentuais ora apresentados não são diretamente considerados nas simulações, mas são representativos da composição do custo em processos, em geral. Por exemplo, dependendo do processo analisado, o custo relacionado à matéria-prima pode variar entre 10 e 80% do custo total de produção; enquanto a mão-de-obra, por exemplo, pode representar entre 10 e 50% do custo total de produção de determinado processo. Evidentemente estes percentuais serão intrinsecamente relacionados ao processo em estudo e às suas particularidades, complexidades e insumos necessários.

**Tabela 5.** Custos das operações e composição de cada item em relação ao custo total (Petrides, Koulouris e Lagonikos, 2002).

<b>Item</b>	<b>Tipo do custo</b>	<b>% do total</b>
Matéria-prima	Direto	10-80
Mão-de-obra	Direto	10-50
Consumíveis	Direto	1-50
Lab/QC/QA*	Direto	1-50
Tratamento de efluentes	Direto	1-20
Utilidades	Direto	1-30
Despesas gerais	Indireto	10-70
Outros	Indireto	0-20

\*Laboratório, Controle de Qualidade e Garantia de Qualidade.

As **matérias-primas** referem-se a todo o custo relacionado aos insumos necessários à fermentação, processo *upstream* e *downstream*, incluindo o custo de todos os meios de fermentação, produtos químicos de recuperação e materiais de limpeza. De acordo com Petrides (2010), “para os bio-produtos químicos de *commodities*, como o etanol, o custo dos meios de fermentação é o principal componente. Para produtos de alto valor, as soluções usadas para recuperação de produtos e limpeza de equipamentos podem ser uma parte importante do custo das matérias-primas”.

Por sua vez, o custo de **mão-de-obra** é estimado com base no número total de operadores necessários no processo. O custo de mão-de-obra estimado é calculado em horas, somando o tempo do operador para completar as várias operações às quais é designado (Petrides, Koulouris e Lagonikos, 2002). Depende também da tecnologia empregada na fábrica, por exemplo, um biorreator altamente automatizado requer menos operadores do que um fermentador mais simples. Isto é, um aumento no CAPEX (automatização) pode implicar em uma diminuição do OPEX (menor custo em mão de obra). O custo da mão-de-obra por hora varia de local para local. Idealmente, um valor médio interno da empresa é usado. Em alternativa, os valores da literatura podem ser tomados (Heinzle, Biwer e Cooney, 2006).

**Consumíveis** são todos os itens usados nos equipamentos e no processo que se desgastam ou precisam ser trocados algumas vezes. Podem ser citados como exemplos de consumíveis em bioprocessos as membranas, resinas cromatográficas, carvão ativado (Petrides, Koulouris e Lagonikos, 2002). Geralmente, em fábricas de produtos químicos, os custos relacionados a consumíveis não são altos. Diferentemente, em plantas de processos biotecnológicos, esse custo é mais expressivo, uma vez que esse tipo de processo geralmente utiliza membranas caras, unidades de adsorção e descartáveis, principalmente na etapa de *downstream* (Heinzle, Biwer e Cooney, 2006).

**Laboratório de Controle de Qualidade (QC) e Garantia de Qualidade (QA)** também fazem parte dos custos relacionados a toda a análise *off-line*, como análises químicas, microbiológicas e bioquímicas e caracterização de propriedades físicas, desde matérias-primas até o produto final (Petrides, Koulouris e Lagonikos, 2002). Este item é mais expressivo para bioprocessos, em que esse fator é de até 60% do custo de mão de obra total em biofármacos, em comparação aos processos químicos, em que esse custo representa entre 10% e 20% do custo operacional (Heinzle, Biwer e Cooney, 2006).

O tratamento de **efluentes** e o descarte de materiais sólidos é outro importante custo operacional, uma vez que o descarte e o tratamento de efluentes são frequentemente regulados

por lei e devem atender aos seus requisitos. Para isso, medidas, processos e procedimentos apropriados estão envolvidos e, obviamente, agregam custo ao processo como um todo.

**Utilidades** também são um fator de custo a ser considerado. Envolve todos os custos referentes a agentes de aquecimento e resfriamento (vapor e água de resfriamento ou outros fluidos), por exemplo, além de eletricidade. Este fator está intrinsecamente ligado ao balanço material e energético do processo (Petrides, Koulouris e Lagonikos, 2002). A quantidade de energia e fluidos necessários ao processo é determinada pela soma da demanda destes de todas as operações da unidade. É razoável adicionar uma quantia para a carga geral de energia e equipamento não listado (Heinzle, Biwer e Cooney, 2006).

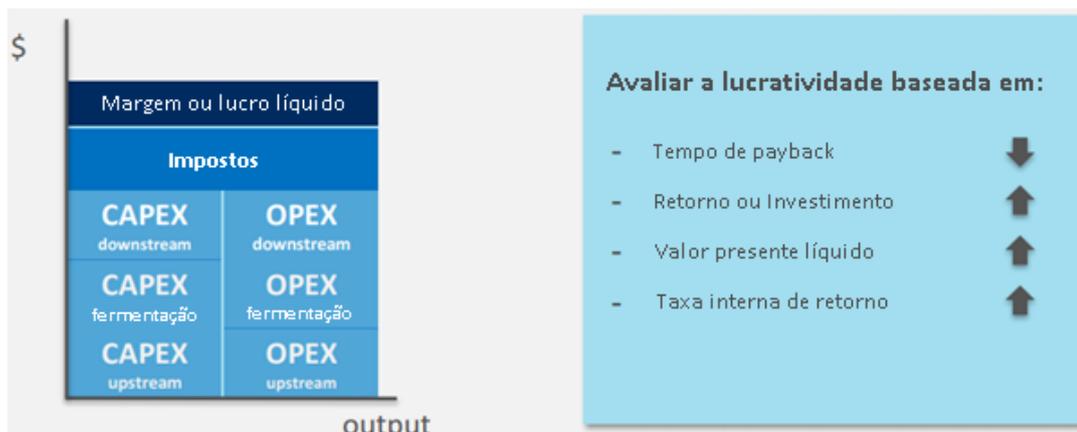
Os **custos indiretos da instalação** são aqueles relacionados a impostos locais, impostos sobre a propriedade, depreciação do investimento de capital fixo, custos de manutenção, seguros e outras despesas do tipo despesas indiretas (Petrides, Koulouris e Lagonikos, 2002).

O fator **diverso** reúne os custos de P&D, validação de processos, despesas de corporação, como *royalties*, propaganda e vendas, ativos de propriedade intelectual (licenças, processos de patentes), despesas de vendas associadas às atividades dos departamentos de marketing e vendas (Petrides, Koulouris e Lagonikos, 2002).

A alimentação do *software* com os dados econômicos gera um custo por unidade do produto final (UPC), que é mensurado pela **razão entre o custo de operação total do bioprocessamento e o total de produto final produzido anualmente**.

Os resultados de uma análise econômica formam um importante fator na tomada de decisões de indústrias em relações a processos, desenvolvimentos e projetos, em geral, gerando, além do custo de produção por unidade do produto de interesse, indicadores econômicos que permitem avaliar e mensurar a lucratividade de um bioprocessamento e sua atratividade, como tempo de *payback* e taxa de retorno.

Todos os indicadores obtidos pela análise técnico-econômica são utilizados para avaliar a lucratividade e a atratividade de um novo projeto. Como mostra a Figura 11, o lucro ou margem é estimado após descontar dos valores de vendas todos os custos e impostos que incidem sobre determinado processo de produção.



**Figura 11.** Gráfico representativo do montante de capitais e custos envolvidos em um processo e as relações dos indicadores econômicos sobre a lucratividade de um processo. Adaptado de (Osseweijer e Straathof, [s.d.]).

Uma possível abordagem para a avaliação da lucratividade de um bioprocessamento, também ilustrada pela Figura 11, baseia-se na interpretação dos indicadores econômicos, sendo desejado que o tempo de *payback* seja o menor possível, e os demais indicadores, tão maiores quanto possíveis, de modo a indicar uma boa atratividade do projeto a ser desenvolvido.

*Payback* é o tempo necessário para que todo o investimento injetado em um projeto seja recuperado por meio do lucro líquido anual cumulativo (Charoensiddhi et al., 2018). Para fins de cálculos, o tempo de *payback* é definido como a razão entre o CAPEX e o lucro líquido anual da planta (Heinzle et al., 2006; Petrides et al., 2002; Vazzoler, 2017).

A Margem Bruta é um indicador, dado geralmente em porcentagem, que relaciona a diferença entre as vendas de um produto e os custos operacionais totais com as vendas totais. Assim, este indicador provê um valor representativo sobre a lucratividade de um produto gerado por um processo de interesse. Assim, é esperado que os valores de margem bruta sejam positivos e, quanto maiores forem, maior é a lucratividade do projeto (Heinzle et al., 2006; Petrides et al., 2002; Vazzoler, 2017).

O Valor Presente Líquido (VPL) é um indicativo econômico utilizado em muitos projetos de engenharia, especialmente naqueles de longo prazo ou que envolvem países com altas taxas e inflação e se referem a projetos/produtos com desenvolvimento não linear nos preços (Zhang, 2017). Assim o indicador VPL aborda o fluxo de caixa de um projeto e lida com as mudanças de um projeto ao longo do tempo, considerando as variações do valor monetário presente.

A variável de Valor Presente Líquido (*Net Present Value* – NPV) pode ser positiva, quando o projeto parece estar crescente em valor, em relação ao valor total do processo. Há, também, a possibilidade de se obter um NPV igual a zero, que leva ao entendimento de que todo o custo de investimento será recuperado ao longo de toda a vida do projeto. Para NPV negativos, indica-se que haverá perdas financeiras ao longo do projeto todo (Zhang, 2017).

Assim, existem três abordagens principais para avaliação da atratividade do indicador NPV: (a) associação de um valor de caixa com uma oportunidade; (b) consideração de diferentes perfis de risco de projetos; e (c) não estabelecer um valor explícito e específico (como o *payback* time, por exemplo), referindo-se mais sobre atratividade e interpretações de cenários do que fornecer valores específicos (Žižlavský, 2014).

O Retorno sobre o Investimento (*Return on Investment* – ROI) é um indicador adicional que se refere à razão entre o lucro e o capital injetado por um certo período, de modo a mensurar o quanto um projeto efetivamente utiliza o capital investido para gerar lucro e, assim, retornar o capital investido (Beer, 2011).

De acordo com a literatura e, por exemplo, com a Figura 11, um processo é mais atrativo quanto menor for o tempo de *payback*, e quanto maiores forem os índices de retorno sobre o investimento e o valor presente líquido. Neste sentido, é importante ressaltar que, embora haja parâmetros teoricamente estabelecidos (por exemplo, sobre os indicadores serem positivos ou, no mínimo, nulos), não existem valores fixos dos indicadores para se chegar a uma avaliação completa de um investimento, de modo que todos os indicativos devem ser sinergicamente analisados, frente a interesses específicos de cada um dos investimentos de interesse.

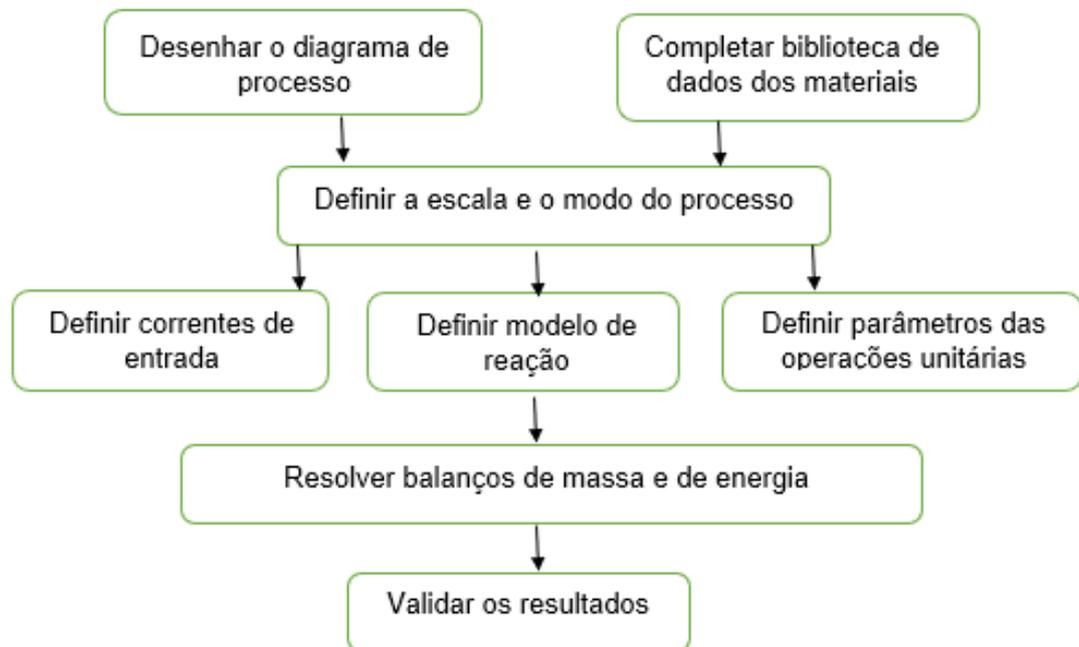
Determinar se o processo é atrativo com base nos parâmetros obtidos pela viabilidade técnica e econômica depende de parâmetros externos a mesma. Como por exemplo, pode-se citar um processo de tratamento de resíduos, não é esperado nem exigido que o mesmo seja lucrativo, normalmente este é considerado como um custo, seja para o atendimento de normas ambientais ou mesmo como um apelo de *marketing*, o qual acrescenta valor a imagem da empresa e aos seus produtos. Outro exemplo seria a produção de vacinas por um órgão governamental, onde o interesse não é obter lucro com a venda das vacinas e sim diminuir o impacto na economia com o afastamento da mão de obra por motivo de doença e diminuir os gastos do setor de saúde pública com o tratamento dos mesmos. Desta forma, não há valores fixos para os parâmetros obtidos durante uma análise de viabilidade técnico-econômica que determinem se um processo é viável ou não.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. *Software* de Simulação e Modelagem

O SuperPro Design<sup>®</sup> (Intelligen<sup>®</sup> Inc., EUA) (versão 9.0) foi o *software* utilizado para as simulações e realizações das análises técnico-econômicas dos bioprocessos para a produção de L-asparaginase explorada por este projeto, bem como para a geração de indicadores e de dados técnico e econômicos.

Em relação à operação e manipulação do *SuperPro Design*<sup>®</sup>, as etapas gerais necessárias para a realização de uma simulação de bioprocesso no *software* selecionado estão representadas pela Figura 12.



**Figura 12.** Etapas para a construção de uma simulação de processo em software simulador. Adaptado de Heinzle, Biber e Cooney, 2006.

Conforme ilustra a Figura 12, para cada um dos bioprocessos estudados, foi seguida a seguinte metodologia:

- Identificação das etapas laboratoriais e, conseqüentemente, das operações unitárias (e suas respectivas condições operacionais);

- Identificação das matérias-primas, consumíveis e insumos envolvidos no processo e alimentação de seus dados físico-químicos ao *software*;
- Elaboração de fluxograma simplificado do processo e de suas operações;
- Identificação de equipamentos e operações não previstos no processo base, mas que seriam necessários em um processo industrial;
- Estimar a demanda de L-asparaginase para cada processo;
- Identificação das matérias-primas e insumos e suas respectivas quantidades, bem como das capacidades dos equipamentos utilizados (utilizando-se um fator de ampliação);
- Selecionar os equipamentos necessários para cada uma das operações unitárias dos processos de produção em estudo;
- Elaborar os fluxogramas de processo no SuperPro Design<sup>®</sup>, compreendendo todas as correntes e operações unitárias interligadas entre si;
- Para cada equipamento, selecionar as operações envolvidas, configurá-las e agendá-las em relação ao sequenciamento de operações unitárias do processo;
- Para as etapas em que ocorrem reações, selecionar um modelo matemático representativo;
- Identificação e inserção dos dados econômicos, obtidos por meio do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e bases de dados digitais; e
- Simulação dos dados econômicos e realização de análises.

#### **4.1.1. Processo base de simulação**

O processo para a produção da molécula de L-asparaginase do tipo Erwinase PEGuilada e purificada considerado neste projeto foi desenvolvido durante o projeto de mestrado de Karin Mariana Torres-Obreque, cuja dissertação intitulada “Desenvolvimento de L-asparaginase PEGuilada de *E. chrysanthemi* para o tratamento de leucemias” foi realizada sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carlota de Oliveira Rangel Yagui no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e publicada em 2017.

Neste projeto, Torres-Obreque (2017) desenvolveu uma rota para a produção de L-asparaginase, utilizando-se *E. coli* recombinante com o gene de *Erwinia chrysanthemi* para a produção da referida enzima e apontando as melhores possibilidades, frente às abrangidas pelo

escopo de seu projeto, para se conduzir laboratorialmente o processo de produção da L-asparaginase em questão, revelando as principais etapas e condições de produção, do *upstream* ao *downstream*.

A Figura 13, a seguir, representa esquematicamente a sequência das operações laboratoriais envolvidas no processo de produção em referência.



**Figura 13.** Diagrama de blocos das principais operações envolvidas no processo de produção de L-asparaginase do tipo Erwinase PEGuilada e purificada desenvolvido por Torres-Obreque (2017).

#### 4.1.2. Seção *upstream*

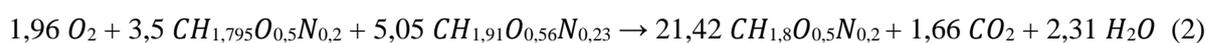
O bioprocesso foi realizado utilizando-se cepa de *E. coli* BL21 (DE3) recombinante com o gene para a produção de L-asparaginase de *E. chrysanthemi*. O processo foi iniciado com o **pré-inóculo**, utilizando-se meio Luria Bertani (LB) (meio complexo composto de triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio), 50 µg/mL de ampicilina e 100µL de cultura BL21 (concentrações de saída). A suspensão foi mantida em agitação constante, em *shaker*, a 180 rpm, 37 °C durante 16 horas, quando atingiu uma densidade óptica (OD) de 2,76, equivalente à concentração celular de 3,2 g/L, segundo curva de calibração realizada por Torres-Obreque (2017). O pré-inóculo é, então, inoculado no biorreator, de acordo com a seção de cultivo, a seguir explicada.

#### 4.1.3. Seção de cultivo

Os cultivos foram desenvolvidos e analisados por Torres-Obreque (2017), de acordo com duas possibilidades: (a) cultivo em biorreator; e (b) cultivo em *shaker*, ou agitador metabólico. Torres-Obreque (2017) constatou que a melhor dentre estas opções é o cultivo em biorreator e, portanto, este foi o tipo de cultivo selecionado para a realização das simulações.

Assim, o **cultivo** (conduzido em meio LB, o mesmo meio complexo utilizado no pré-inóculo) foi realizado em batelada e em biorreator e com 10% em volume de pré-inóculo e conduzido aerobicamente, com alimentação constante de ar, ajustada em 1 vvm. O cultivo foi mantido em agitação constante de 600 rpm, a 37 °C, durante 5 horas, chegando à concentração celular de 3,2 g/L (base seca). Ainda, após 2 horas do início do cultivo, foi adicionado IPTG 0,1 mM para indução, também sendo utilizada ampicilina (50 µg/mL).

O modelo matemático adotado para fins representativos da fermentação, para a conversão dos nutrientes do meio LB em biomassa, está a seguir representado pela Equação 2 e é baseado no modelo de (Doran, 1995), utilizado no capítulo de produção de plasmídeo de (Heinzle, Biwer e Cooney, 2006), em que os coeficientes foram calculados por balanços estequiométricos de C, H, O e N, assumindo iguais consumos de triptona e de extrato de levedura. Os balanços estequiométricos foram calculados com o suporte da função Solver do Excel (Microsoft Inc).



As fórmulas empíricas do extrato de levedura ( $CH_{1,91}O_{0,56}N_{0,23}$ ), da triptona ( $CH_{1,795}O_{0,5}N_{0,2}$ ) e da biomassa ( $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$ ), em suas formas reduzidas, foram obtidas em Heinzle et. al (2007) e Doran (1995). Outra hipótese assumida foi em relação à composição da célula. Neste caso, considerou-se que as células são compostas por 80% de água.

#### 4.1.4. Seção de *downstream*

Finalizada a etapa de cultivo, o produto foi submetido durante 30 minutos a uma primeira **centrifugação** (8000xg) para a separação das células. Os sobrenadantes foram descartados e as células submetidas à fase de extração.

A etapa de extração consiste na retirada da L-asparaginase que, neste caso, é encontrada tanto no citoplasma como no espaço periplasmático, não sendo a enzima transportada para o meio extracelular (Torres-Obreque et al., 2019).

Neste sentido, Torres-Obreque (2017) avaliou o processo de extração sob dois aspectos: (a) lise celular por ultrassom; e (b) lise celular por choque osmótico. As avaliações do estudo conduzido mostraram que o segundo procedimento é o mais adequado e, por tal razão, foi escolhido o choque osmótico como operação para extrair a L-asparaginase.

Desta forma, as células extraídas da centrifugação foram ressuspensas, sob agitação durante 10 minutos, em tampão Tris-HCL 33 mM, sacarose 20% e EDTA 1,0 mM. Após o referido tempo, a solução foi centrifugada (10.000xg) e transferidas às etapas subsequentes, de purificações e PEGuilação. Em relação à modelagem e apenas para efeitos representativos, considerou-se que as células liberaram fragmentos celulares, endotoxina, proteínas contaminantes e L-asparaginase.

A purificação da L-asparaginase foi conduzida em coluna de troca catiônica de 5 mL (HiTrap SP FF – GE Healthcare®), com resina SP Sepharose, equilibrada em fluxo de 3 mL/min e 5 volumes de coluna (*column volume* – CV) com tampão de fosfato de potássio 20 mM e pH 5,5. Na sequência, a amostra foi injetada com fluxo de 3 mL/min, após ser submetida à troca de tampão. A eluição da ASNase foi realizada em “*step*” com 3 CV de tampão fosfato de potássio, 20 mM, pH 7,5 e em fluxo de 3 mL/min. A coluna foi lavada (regeneração de resina) com 1 M de NaCl, em 5 CV e fluxo de 5 mL/min.

A L-asparaginase purificada foi submetida à reação de PEGuilação. Neste sentido, à enzima obtida foi adicionado metoxi-poli(etileno)glicol carboximetil N-hidroxissuccinimidil éster (mPEG-NHS) 10 kDa e em proporção 1:50 (enzima:PEG), durante 30 minutos e agitação constante, sendo a temperatura mantida em 22 °C. Ao final dos 30 minutos, foi adicionada hidroxilamina 2 M. Para a reação de PEGuilação, o rendimento foi de 50% de L-asparaginase monoPEGuilada em relação à L-asparaginase nativa. O modelo simplificado para a representação da reação de PEGuilação está apresentado na Equação 3.



Os coeficientes estequiométricos foram calculados com o auxílio da função Solver do Excel (Microsoft, Inc.), assumindo-se 50% de rendimento para a L-asparaginase monoPEGuilada, sendo as demais formas polidispersas, poliPEGuiladas consideradas como “proteínas contaminantes” (PC).

Após a etapa de PEGuilção, a solução foi encaminhada a uma nova etapa de purificação, que consiste, segundo Torres-Obreque (2017), a uma etapa única em cromatografia de exclusão molecular, em que se obteve o produto final, a mono-PEG L-asparaginase do tipo Erwinase produzida utilizando-se *E. coli* recombinante. Nesta etapa, foi utilizada uma coluna Superdex 200 Inceze 10/300 GL (GE Life Sciences), a qual foi equilibrada com tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5 e então prosseguiu-se à eluição isocrática.

Para a simulação da produção de L-asparaginase nativa pelo mesmo processo desenvolvido por Torres-Obreque et al. (2019), foram desconsideradas as etapas da PEGuilção em diante. Desta forma, as etapas principais simplificadas deste segundo processo estão representadas no diagrama ilustrado pela Figura 14.



**Figura 14.** Diagrama de blocos das principais operações envolvidas no processo de produção de L-asparaginase do tipo Erwinase purificada, baseado no processo desenvolvido por Torres-Obreque (2017).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Dimensionamento da planta e do processo

O processo foi dimensionado considerando a demanda anual do Brasil por biofármacos de L-asparaginase, tida como a quantidade total de doses adquiridas pelo Ministério da Saúde (relação entre o valor total destinado para a importação de biofármaco de L-asparaginase e o valor unitário de tal biofármaco). Assim, foi adotada uma demanda correspondente a 62.000 doses de biofármaco de L-asparaginase por ano (Câmara dos Deputados, 2017). Este valor de doses foi estimado com base no material disponibilizado pelo Ministério da Saúde (Câmara dos Deputados, 2017; Ministério da Saúde, 2017), em que são divulgados o valor de contato de compra anual de L-asparaginase e o valor unitário, de forma que, pela razão de tais dados, foi obtida a estimativas de doses.

Tendo como base tal quantidade de doses, seguiu-se a uma estimativa da quantidade em massa de L-asparaginase, para estabelecer as demandas para simulação. Desta forma, para o biofármaco de L-asparaginase monoPEGuilada, foi adotada uma demanda nacional anual de 1 kg de L-asparaginase, conforme exposto a seguir.

#### *Atividade específica mono-PEG*

<i>ASNase:</i>	357	U/mg	Torres-Obreque (2017)
<i>Dose adotada:</i>	3750	UI	(Bula Oncaspar®)
<i>N de doses:</i>	62.000	Doses	
<i>Demanda (em massa):</i>	651.261	mg	<b>Demanda adotada: 1 kg</b>

Para os cálculos de demanda referentes ao biofármaco de L-asparaginase monoPEGuilada adotou-se a mesma dose do medicamento Oncaspar®, uma vez que ainda não há estudos neste sentido sobre tal biofármaco e a molécula do medicamento Oncaspar® é uma versão PEGuilada da L-asparaginase nativa e, portanto, é a que mais se assemelha bioquimicamente ao biofármaco em estudo.

Já para as simulações da enzima nativa obtida por processo similar àquele estudado da L-asparaginase monoPEGuilada, a demanda considerada foi de 2,5 kg de L-asparaginase por ano, de acordo como a seguir exposto.

<i>Atividade específica Leuginase:</i>	269*	U/mg	
<i>Dose de Leuginase:</i>	10000	UI	(Bula Leuginase®)
<i>N de doses:</i>	62.000	Doses	
<i>Demanda (em massa):</i>	2.304.833	Mg	<b>Demanda adotada: 2,5 kg</b>

\* valor de referência da L-asparaginase do Laboratório da FCF-USP, adquirida da ProsPec-Tany (ENZ-287, Israel).

Neste segundo cenário, para efeitos de cálculos e de comparação, o biofármaco em simulação foi comparado à Leuginase®, por corresponder a uma molécula comercialmente disponível mais semelhante à enzima nativa.

Embora tenham sido utilizados mesmos números de doses para ambos os casos, é evidente que, se a versão PEGuilada, por exemplo, fosse ser utilizada como primeira linha de tratamento, as doses necessárias seriam, obviamente, muito inferiores.

Em relação ao *design* da planta, o biorreator principal foi definido com capacidade igual a 500 L e o biorreator para o pré-inóculo foi assumido com capacidade igual a 50 L. Para ambos os biorreatores assumiu-se um percentual igual a 90% para volume de operação em relação ao volume total, além de 20% de volume *de gas hold up* (volume de ar que fica preso no meio de fermentação devido a aeração).

O tempo de operação da planta, constituída em São Paulo, mas com valores de equipamento considerados em dólar (segundo default do *software* utilizado) foi configurado como igual a 330 dias úteis anuais, correspondendo a 7.920 horas. Os biorreatores operam em batelada.

A Tabela 6 mostra os principais parâmetros de processo assumidos para a simulação do bioprocesso de Torres-Obreque (2017, 2019).

**Tabela 6.** Principais parâmetros e dados do processo de Torres-Obreque (2017, 2019) utilizados na simulação.

<b>Parâmetro</b>	<b>Dados</b>
Concentração celular final do fermentador (com pré-inóculo de 10%)	3,2 g/L
Concentração de enzima após a extração (assumindo 50% do total de proteína obtido)	0,2251 g/L
Volume nominal do fermentador	500 L
Volume útil do fermentador	90%
Gás <i>hold-up</i> do fermentador	20%
Temperatura	37 °C
$\mu$ (velocidade específica)	0,95 h <sup>-1</sup>
Rendimento da primeira purificação (coluna troca iônica)	69%
Rendimento da reação de PEGuilação	50%
Rendimento da segunda purificação	50%
Tempo de operação anual da planta	7920 h (330 dias)

## 5.2. Simulação e modelagem dos bioprocessos em análise

Levando-se em consideração os dados e parâmetros do bioprocessos disponibilizados na Tabela 6, foram calculadas as quantidades das correntes de meio de cultivo LB a serem adicionadas no fermentador principal e no tanque de inóculo. Para a determinação destas correntes, os dados foram planilhados conforme apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7.** Dados para volumes úteis para o fermentador principal e para o pré-inóculo.

<b>Parâmetros</b>	<b>Fermentador Pré-Inóculo</b>	<b>Fermentador Principal</b>
Volume útil (%)	90	90
<i>Gas Hold up</i>	20	20
Densidade (kg/L)	1	1
Volume total (L)	50	500
Volume (L) - líquido + gás	45	450
Volume (L) - líquido*	36	360**
Ar (vvm)	1	1
Oxigênio/ar (%)	21	21

\* volume correspondente ao meio de cultivo.

\*\* volume total do fermentador principal (considerando a alimentação do pré-inóculo)

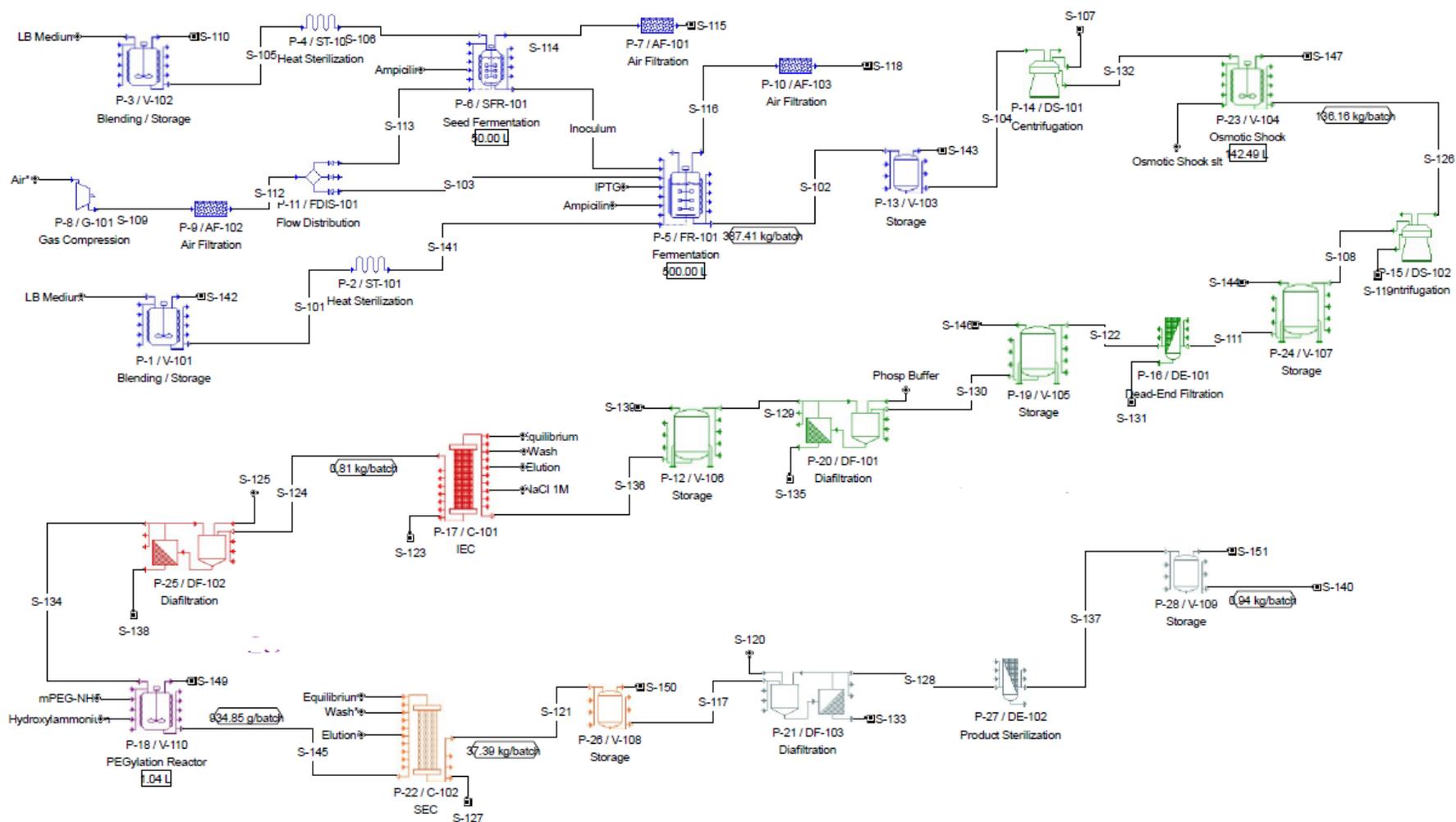
Considerando que Torres-Obreque (2017) utilizou 500 mL de meio em um biorreator de 2 L para o cultivo principal e considerando-se os 360 L de volume de meio do fermentador principal adotado, chega-se a um fator de ampliação de aproximadamente 720 vezes. Determinados os volumes úteis de cada um dos fermentadores envolvidos (principal e do pré-inóculo), seguiu-se à determinação das quantidades das correntes de alimentação. Para isto, naturalmente foi considerada a composição do meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e cloreto de sódio 5 g/L) e os volumes úteis de líquido especificados na Tabela 7. Desta forma, como mostra a Tabela 8, foram estimados os fluxos de alimentação de ambos os fermentadores presentes do processo.

**Tabela 8.** Dados das massas de alimentação dos fermentadores, por batelada, considerando cada um dos componentes do meio LB.

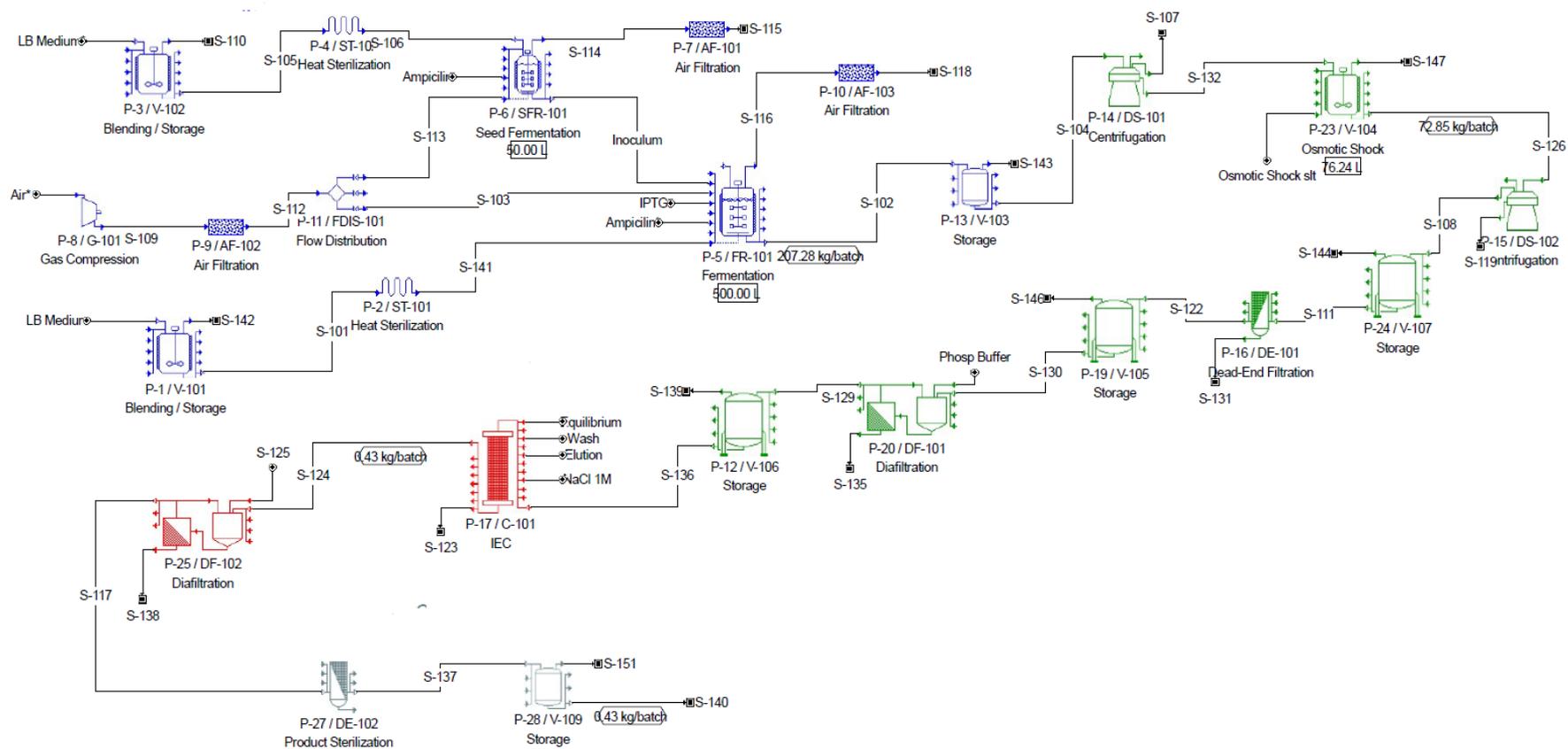
	<b>Água (kg)</b>	<b>Inóculo (kg)</b>	<b>Triptona (kg)</b>	<b>Ext. Levedura (kg)</b>	<b>NaCl (kg)</b>
<b>Inóculo</b>	35	0	0,36	0,18	0,18
<b>Fermentador</b>	318	36,00	3,24	1,62	1,62

As quantidades de cloreto de sódio, extrato de levedura e triptona foram determinados com base em suas concentrações aplicadas aos volumes úteis de líquido de cada fermentador. As quantidades de água consistem nas quantidades complementares dos volumes totais úteis.

Conhecidas as correntes de alimentação principais, os parâmetros e condições de processo e as etapas e operações dos bioprocessos em estudo, foram elaborados os fluxogramas de processo para os dois procedimentos em análise: com e sem PEGuilação da molécula-alvo.



**Figura 15.** Fluxograma de processo para a produção de L-asparaginase monoPEGuilada elaborado pelo software SuperPro Design®, baseado em Torres-Obreque (2018), compreendendo as etapas do upstream ao downstream, sem considerar as operações e etapas de envase.



**Figura 16.** Fluxograma de processo para a produção de L-asparaginase nativa elaborado pelo software SuperPro Design®, adaptado com base em Torres-Obreque (2017).

Para a simulação do processo de produção de crisantaspase não-PEGuilada (Figura 16), foram removidas as operações relacionadas às etapas de PEGuilção, como o reator para reação de PEGuilção e etapas subsequentes de purificação em coluna SEC. Nesse sentido, o fluxograma que representa a produção de crisantaspase pelo mesmo processo da Figura 15, compreende as mesmas operações, exceto aquelas voltadas à PEGuilção e às demais operações subsequentes.

Para a elaboração dos fluxogramas de processo, além das demandas e dos dados referentes aos fermentadores principal e de pré-inóculo (SFR-101 e FR-101, respectivamente), também foram necessários os ajustes das demais correntes de alimentação das operações (como as correntes de adição de ampicilina e de IPTG, por exemplo). Tais correntes foram estimadas com base nos protocolos adotados por Torres-Obreque (2017) e nas correntes de saída do fermentador principal.

A partir das etapas de inóculo e de fermentação, foram estimadas as quantidades de ampicilinas adequadas para a escala do processo adotado. Assim, no simulador, as concentrações de ampicilina alimentadas foram ajustadas a uma concentração de 50 g/L, sendo seus volumes calculados de acordo com a proporção de 50  $\mu$ L de solução de ampicilina para cada 50 mL de meio de cultivo. Tomando-se tal correlação e os volumes dos meios dos fermentadores principais e de pré-inóculo, foram calculados os volumes de solução de ampicilina adicionados a cada um de tais equipamentos (SFR-101 e FR-101).

No fermentador principal (FR-101, em ambos os fluxogramas, representados pelas Figuras 15 e 16), para o cálculo da corrente de entrada de IPTG, foi ajustada a concentração de entrada de solução de IPTG 0,1 M (solução de alimentação na concentração de 23,8 g/L), também respeitando a proporção de 50  $\mu$ L de solução de IPTG para cada 50 mL de meio.

As operações de extração da L-asparaginase das células (representadas no fluxograma pelo tanque V-104, Figuras 15 e 16) requerem a adição de uma suspensão aquosa hipertônica compreendendo Tris-HCl, sacarose e EDTA, sendo que suas quantidades foram calculadas com base no protocolo utilizado por Torres-Obreque (2017), segundo o qual, para cada 0,5 g de célula, são necessários 20 mL de solução hipertônica, ajustada no software para compreender EDTA 0,1 M, Tris 3,3 M e sacarose 20%.

As colunas de cromatografia foram escolhidas a partir da seleção de colunas comercialmente disponíveis, tendo sido escolhidas uma coluna de troca iônica (C-101) de 10

cm de diâmetro por 20 cm de altura e uma coluna SEC (C-102) de 20 cm de diâmetro por 60 cm de altura, ambas as colunas com resina do tipo Sepharose (foi utilizada uma capacidade de retenção de resina de 50 g/L).

A coluna de troca iônica foi operada iniciando-se por uma etapa de equilíbrio com solução tampão de fosfato de potássio 20 mM, pH 5,5 (5 CV), seguida de carregamento, lavagem (3 CV) com solução tampão de fosfato de potássio 20 mM, pH 5,5 e da eluição, com solução tampão de fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5 (2 CV). Por fim, a coluna passou por uma etapa de regeneração com NaCl 1 M. As velocidades lineares foram mantidas em conformidade ao relatado por Torres-Obreque (2017).

Já a coluna SEC, por sua vez, teve sua operação conduzida pelas etapas sequenciais de equilíbrio com solução tampão de fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5, carregamento (5 CV), lavagem e eluição com solução tampão de fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5. As velocidades lineares, nesta coluna, foram definidas, em todas as etapas como 30 cm/h.

Para o primeiro processo, que envolve PEGuilação (representada pelo equipamento V-110), as correntes de solução de hidroxilamônio foram ajustadas como tendo uma concentração de entrada correspondente a 2 M, com volume igual a 10% do volume da mistura reacional. Ainda no equipamento de PEGuilação, para a corrente de metóxi-PEG, foi respeitada a razão molar é 1:50 (enzima:PEG), com base nos dados reportados por Torres-Obreque (2018).

Outro importante ponto a ser discutido acerca da elaboração dos fluxogramas e simulação dos bioprocessos é o fato de os processos utilizados como base dos estudos deste trabalho foram baseados em resultados obtidos em escala laboratorial, enquanto as simulações e estudos aqui realizados objetivam atingir uma escala piloto ou industrial. Neste sentido, muitas etapas que não foram visualizadas e usadas na escala laboratorial precisavam ser consideradas nas escalas ampliadas.

Nesse sentido, com o objetivo de ampliar o processo laboratorial para industrial, é fundamental levar em consideração, após a fermentação, etapas e operações unitárias, tais como, centrifugação, homogeneização, ultrafiltração, diafiltração e etapas da formulação, as quais, embora não previstas em laboratório são essenciais para a operação adequada em uma planta industrial (Nandi et al., 2016), como pode ser observado na Figura 17, que representa um diagrama que ilustra as sequências mais comuns de produção de enzimas.



**Figura 17.** Diagrama de bloco ilustrativo das operações envolvidas em produções industriais de enzimas. Adaptado de Nandi et al., 2016.

Assim, algumas operações unitárias foram incluídas no fluxograma, para atender às necessidades do processo industrial. Além disso, a ampliação do processo foi realizada exclusivamente ajustando a corrente de saída (produção total anual) do processo, isto é, informando ao programa qual é a demanda anual do processo.

Partindo da seção *upstream*, equipamentos como um compressor (G-101) foram incluídos nas correntes de ar, de modo a garantir o suprimento de ar nas condições exigidas. Como adaptações técnicas, os filtros de ar (AF-101, AF-102 e AF-103) foram igualmente incluídos após o compressor e nas saídas de gases de exaustão para esterilizar o ar fornecido aos fermentadores e os gases liberados à atmosfera.

Além disso, tanques pulmão (V-101 e V-102) foram adicionados para armazenamento do meio para garantir que os fermentadores sejam alimentados com o meio nos momentos apropriados, evitando riscos de desabastecimento. Antes de serem alimentados aos fermentadores, o meio é submetido a esterilizações por calor (ST-101, ST-102), a fim de fornecer aos fermentadores um meio que cumpra os padrões de qualidade, ou seja, isento de contaminações.

Após a seção de fermentação, o caldo segue para um tanque pulmão (V-103), de modo a garantir uma vazão constante entre as operações unitárias anteriores e o próximo equipamento, garantindo o armazenamento durante os ciclos de operação dos equipamentos subsequentes.

A seção de *downstream* começa com uma primeira centrifugação (DS-101), seguida pelo choque osmótico e a segunda centrifugação (DS-102), ambas discutidas anteriormente. Depois disso, foi incluído um filtro (DE-101), como etapa de polimento, já que centrifugas

contínuas não possuem uma eficiência de 100% de remoção de particulados, antes da primeira purificação.

Posteriormente, uma operação de diafiltração (bem como as outras diafiltrações incluídas, que não foram previstas pelo estudo de laboratório) foi incluída. A diafiltração muitas vezes se destina a trocar um solvente ou solução tampão (para ajuste do pH e da força iônica) para ressuspensão de células ou macromoléculas, em geral, como é o caso da enzima crisantaspase (Doran, 1995). Nesse sentido, as aplicações mais comuns desse tipo de operação estão relacionadas à dessalinização da solução contendo proteínas e troca de tampões para ajuste de pH e, por este motivo, as diafiltrações são comumente realizadas entre duas etapas de cromatografia (Heinzle, Biber e Cooney, 2006).

Nas operações de diafiltração, etapas de concentração também foram incluídas com base nos dados de concentração atingidos por Torres-Obreque (2017, 2019), de modo que as diafiltrações concentram a solução às concentrações relatadas com os trabalhos citados. Essas etapas de concentração são atualmente usadas para células e macromoléculas, a fim de diminuir o volume de solvente necessário para a diafiltração. Vale ressaltar que as diafiltrações foram adicionadas com base em dados e informações da literatura, sem serem testadas em laboratório. São etapas, portanto, que precisam ser posteriormente estudadas, avaliadas e otimizadas.

Além disso, outra adaptação realizada em relação ao processo laboratorial base foi em relação à produção de endotoxinas, porque a remoção de endotoxinas é fundamental, uma vez que é amplamente conhecido que bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, produzem grandes quantidades deste contaminante, pois representa um risco para produtos farmacêuticos, uma vez que são tóxicos (Pessoa Junior et al., 2014; Jungbauer, 2010). Entretanto, uma vez que as concentrações de endotoxinas não foram determinadas por Torres-Obreque (2019), assumiu-se a hipótese de que tal impureza é removida nas etapas de cromatografia já utilizadas e previstas pelo processo base.

Não foram consideradas nestas simulações as etapas finais de envase do produto na forma líquida, como ocorre para a enzima PEGuilada, e de liofilização, para a enzima nativa. Embora sejam operações necessárias, a ausência de dados nestes sentidos sobre a molécula em análise, levaram à exclusão, neste momento, de tais etapas das análises e simulações realizadas. A relação completa dos equipamentos utilizados, bem como suas respectivas especificações estão disponíveis no Anexo A.

### 5.3. Análise geral dos processos

Com base nas características e nos processos anteriormente descritos e nas adaptações assumidas para visar a uma adaptação a um processo piloto/industrial, foram simulados os aspectos técnicos e econômicos destes processos, cujas principais informações e dados obtidos acerca dos sumários executivos estão a seguir relacionados na Tabela 9. Para ambos os processos, foi considerado um tempo de ciclo de 20 h entre o início de duas bateladas consecutivas (já considerando um tempo de folga), isto é, o tempo mínimo possível entre o início de duas bateladas consecutivas, que corresponde ao tempo de ciclo de equipamento mais longo entre todos os equipamento (excluindo aqueles que são ignorados pelos cálculos de programação).

**Tabela 9.** Sumário executivo dos processos simulados, compreendendo dados gerados pelo SuperPro Design® para os processos (1): enzima PEGuilada e (2): enzima nativa.

	Processo (1)	Processo (2)
Bateladas/ano	359	359
Investimento de capital (US\$)	32.238.979	25.230.835
Custos operacionais/ano (US\$)	13.391.776	8.656.634
Produção Anual	1 kg	2,5 kg
Custo de produção unitário (UPC)	US\$ 12,37 /mg	US\$ 3,46 / mg

Embora tenham sido selecionadas as demandas e produções anuais de cada um dos processos, cabe ressaltar que a planta do processo (1) tem capacidade para realização de 383 bateladas por ano (correspondente a aproximadamente 1,3 kg de L-asparaginase monoPEGuilada), enquanto a planta do processo (2) tem capacidade para 435 bateladas por ano (correspondente a aproximadamente 5,3 kg de L-asparaginase). Assim, resta claro que a planta do processo (2) está bastante subaproveitada e poderia, portanto, produzir quantidades de L-asparaginase além do mercado nacional, de acordo com as estimativas de demanda para o Brasil consideradas.

Além disso, para fins de comparação dos valores de produção obtidos para a L-asparaginase, é essencial realizar uma comparação com biofármacos análogos já disponíveis no

mercado. Neste contexto, já que para o processo estudado não há informações sobre formulação e nem mesmo testes clínicos para conhecimento de dosagem e método de tratamento, fazer comparações com valores de doses faria com que fossem necessárias a adoção muitas hipóteses e incertezas. Assim, uma base de comparação mais adequada seria a comparação de valores por miligrama de cada uma das opções de biofármacos de L-asparaginase disponíveis.

A Tabela 10 representa estimativas do custo por miligrama de três tipos de biofármacos de L-asparaginase comercializados: Spectrila<sup>®</sup>, Leuginase<sup>®</sup> e Oncaspar<sup>®</sup>.

**Tabela 10.** Estimativas do custo por miligrama de diferentes biofármacos de L-asparaginase disponíveis: Spectrila<sup>®</sup>, Leuginase<sup>®</sup> e Oncaspar<sup>®</sup>.

<b>Biofármaco</b>	<b>Preço (USD)*</b>	<b>Dose (UI)</b>	<b>Atividade (U/mg)**</b>	<b>Valor (US\$/mg)</b>
Leuginase <sup>®</sup>	38	10000	269	1.02
Spectrila <sup>®</sup>	582,17	10000	269	15.66
Oncaspar <sup>®</sup>	1.619,10	3750	269	116.14

\*Tabela 3

\*\*foi utilizado o valor de referência da enzima da Prospec-Tany, pois não foram identificados os dados específicos de cada enzima

Dentre as opções demonstradas na Tabela 10 e em comparação com os processos estudados, a Leuginase<sup>®</sup> é o biofármaco cuja enzima mais se aproximaria da L-asparaginase nativa; em contrapartida, a Oncaspar<sup>®</sup> representaria o biofármaco com enzima mais parecida com a L-asparaginase monoPEGuilada, embora existam diversas diferenças.

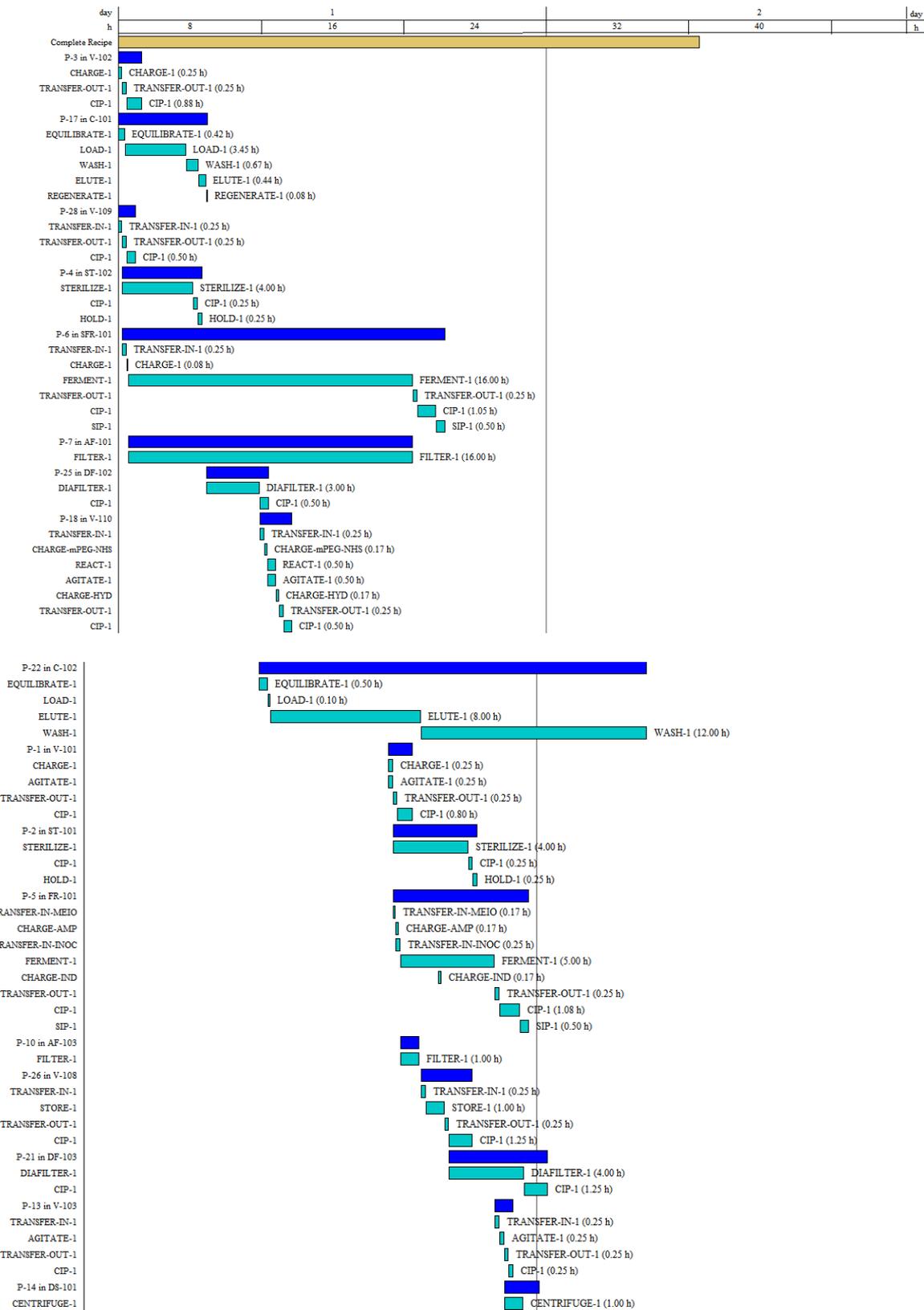
Seguindo tal base de comparação, a enzima nativa do processo simulado mostra-se com custo superior à Leuginase<sup>®</sup>, cuja estimativa foi de US\$ 1,02/mg, já que seu UPC foi de US\$ 3,46/mg, de acordo com os dados da simulação. Ainda assim, parece ser uma opção competitiva, já que este valor de UPC tem como base um processo ainda não otimizado. Assim, em um processo melhor estudado, a L-asparaginase nativa produzida pelo processo similar ao de Torres-Obreque (2017) poderia ter um custo mais competitivo, sob o ponto de vista econômico, e de fato ser uma opção à Leuginase<sup>®</sup>. Já em relação à L-asparaginase monoPEGuilada, o seu UPC de US\$ 12,46/mg é bastante inferior ao valor estimado para a Oncaspar<sup>®</sup>, de US\$ 116,14/mg, que seria a opção mais próxima disponível no mercado. Na verdade, o UPC da L-asparaginase monoPEGuilada ficou próximo à estimativa feita para a Spectrila<sup>®</sup>, correspondente a US\$ 15,66/mg.

Em relação à simulação, a aplicação dos parâmetros de produção aos equipamentos da simulação envolve o agendamento de uma operação unitária em relação à sua posterior, o que possibilita gerenciar o processo com suas bateladas sucessivas e com a disponibilidade de equipamentos quando necessários. Um dos diagramas gráficos mais conhecidos para o gerenciamento de processos é o chamado Gantt Chart, desenvolvido no início do século XX (Wilson, 2003).

O diagrama de Gantt basicamente consiste em um gráfico de barras, em que cada barra consiste em uma operação unitária e em que o eixo longitudinal representa o tempo, desde o início do processo, indicando a duração de cada uma das operações e, ainda, a forma como estão temporariamente associadas umas em relação às outras. Dentro de cada operação unitária, ficam dispostos os procedimentos envolvidos (como, por exemplo, carregamento, transferência, reação, limpeza), bem como as suas distribuições dentro da operação unitária a que pertencem (Wilson, 2003).

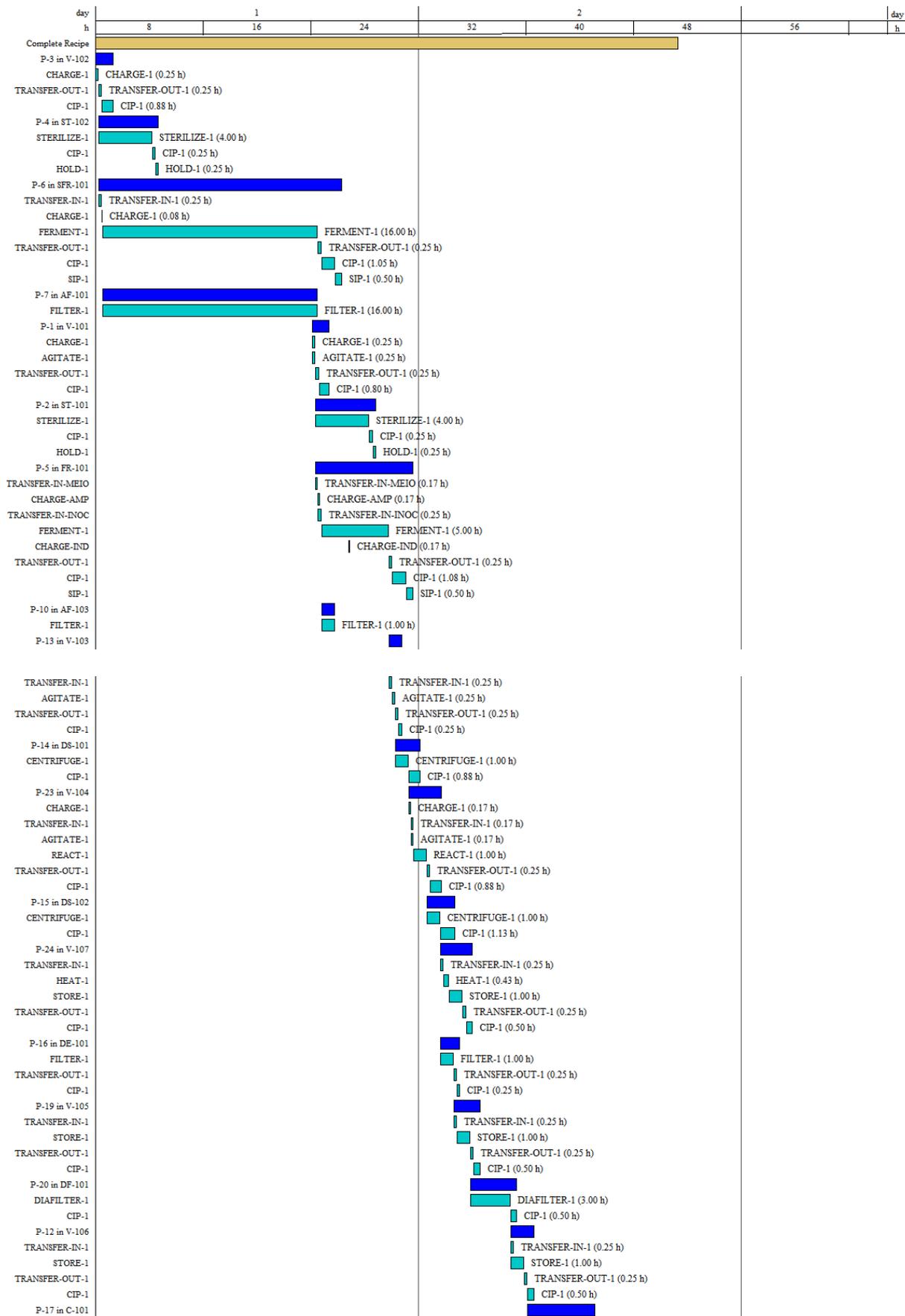
Outro diagrama gerado pelo *software* SuperPro Design<sup>®</sup>, o diagrama de Ocupação dispõe o uso dos equipamentos em relação ao tempo, permitindo associar os seus usos, em relação ao tempo, para as bateladas múltiplas e verificar, assim, as disponibilidades dos equipamentos e os gargalos operacionais do processo como um todo, avaliando-o pelos seus sucessivos ciclos.

As Figuras 18 e 19, a seguir, representam os diagramas de Gantt para os processos de produção da L-asparaginase PEGuilada e nativa, respectivamente, em que estão disponíveis todos os procedimentos elencados na programação de cada uma das operações unitárias.





**Figura 18.** Diagrama de Gantt (batelada única) para o processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada, em que as barras azuis escuras se referem a cada operação unitária e as barras azuis claras se referem aos procedimentos dentro de cada uma das operações unitárias, listadas no eixo vertical da imagem.



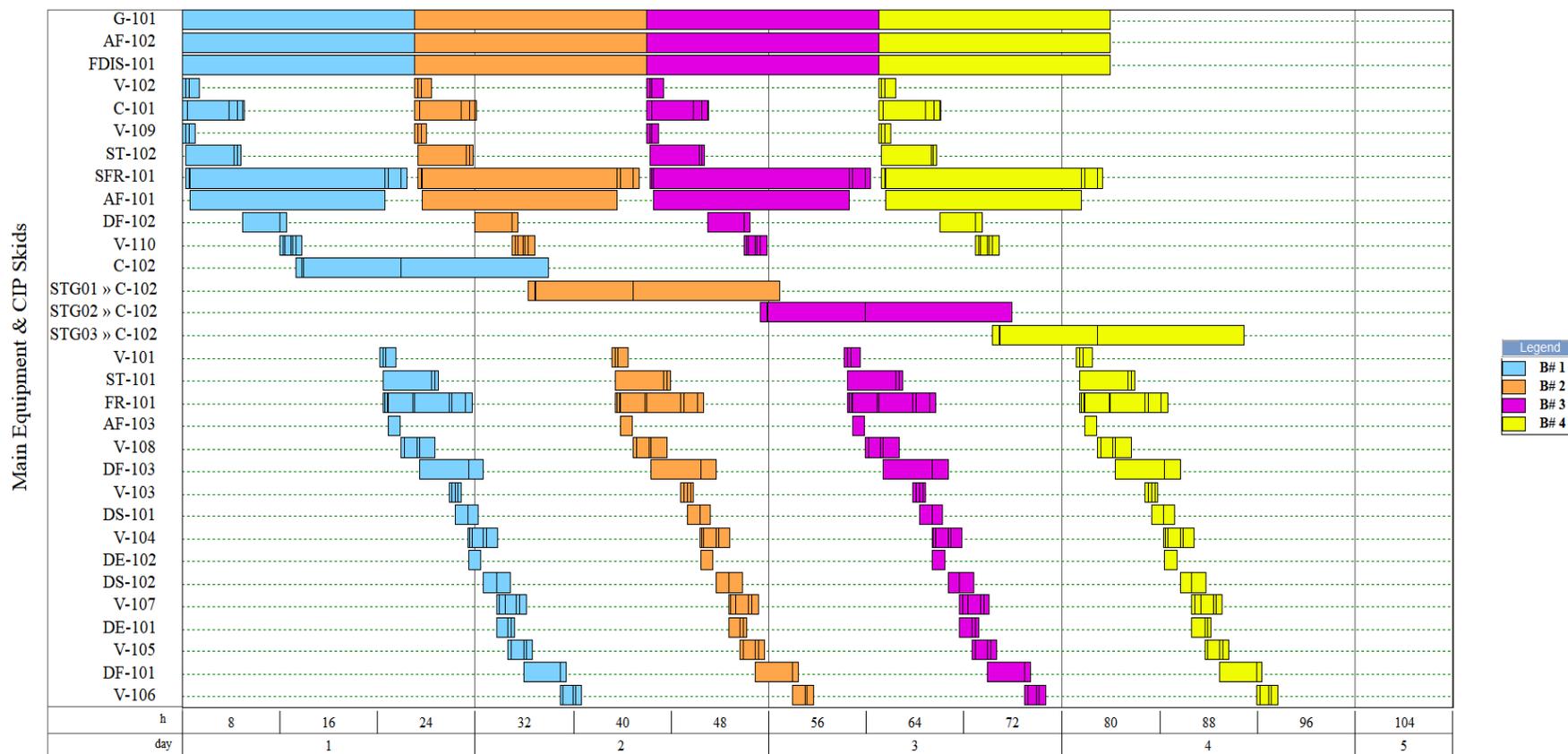


**Figura 19.** Diagrama de Gantt (batelada única) para o processo de produção de L-asparaginase nativa, em que as barras azuis escuras se referem a cada operação unitária e as barras azuis claras se referem aos procedimentos dentro de cada uma das operações unitárias, listadas no eixo vertical da imagem.

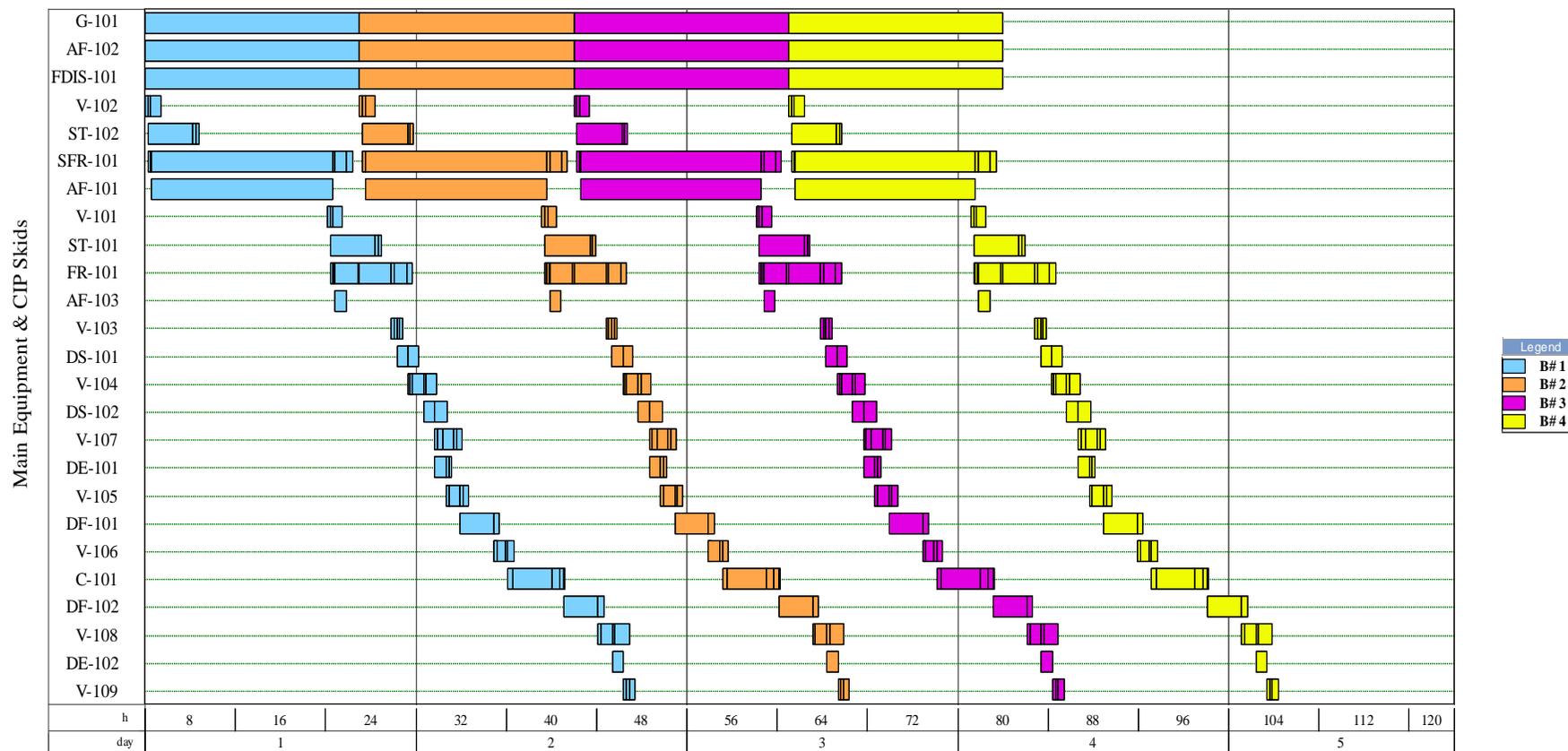
Como pode ser apreendido dos diagramas, em relação ao tempo de operação unitária, a operação do inóculo (SFR-101) é considerada um ponto de atenção em relação ao processo. De fato, o tempo de inóculo de 16 h reportado por Torres-Obreque (2019) é bastante longo e poderia ser um fator a ser otimizado dentro do processo. Para o processo de produção da enzima nativa, por exemplo, o inóculo é a operação unitária responsável pelo maior tempo de uma batelada. Este fator fica em um segundo plano para o processo de produção da L-asparaginase monoPEGuilada, no qual a operação da coluna de exclusão molecular (C-102), utilizada após a PEGuiladação mostrou-se a mais duradoura, com um ciclo de 20 h, sendo notavelmente uma operação que deve ser melhor observada e avaliada dentro do processo.

Em relação às ocupações dos equipamentos em bateladas múltiplas, as Figuras 20 e 21 representam os diagramas de ocupação referentes aos processos de produção da L-asparaginase PEGuilada e nativa, respectivamente.

Nos diagramas de ocupação representados, os processos estão representados por suas operações unitárias (especificadas no eixo vertical) em barras horizontais, em relação ao tempo (eixo horizontal). São considerados, em cada diagrama, quatro ciclos de bateladas sucessivos, sendo que cada cor representa uma batelada, conforme legendas nas figuras.



**Figura 20.** Diagrama de ocupação de equipamentos (bateladas múltiplas) para o processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada, em que cada cor se refere a uma batelada, conforme legenda, sendo representadas quatro sucessivas bateladas. As barras horizontais se referem aos equipamentos indicados no eixo vertical.



**Figura 21.** Diagrama de ocupação de equipamentos (bateladas múltiplas) para o processo de produção de L-asparaginase nativa, em que cada cor se refere a uma batelada, conforme legenda, sendo representadas quatro sucessivas bateladas. As barras horizontais se referem aos equipamentos indicados no eixo vertical.

Para fins de interpretação, quando em diagramas de ocupação de equipamentos, em bateladas sucessivas, uma barra correspondente a um equipamento fica muito próxima de sua posterior, pode-se classificar a operação correspondente a este equipamento como um gargalo do processo. Assim como no diagrama de Gantt, duas etapas foram identificadas como os principais gargalos do processo: o inóculo (SFR-101), presente nos dois processos, e a coluna de exclusão molecular (C-102), presente na purificação do processo de produção da enzima monoPEGuilada.

Conforme ilustrado na Figura 20, para o processo de produção da L-asparaginase monoPEGuilada, a operação de purificação da enzima após a PEGuilagem foi considerada como a etapa mais problemática do processo, sendo necessários quatro equipamentos (representados no diagrama por C-102, STG-01, STG-02 e STG-03) para satisfazer às necessidades e a sequência de operações do processo, dado o longo tempo de operação deste equipamento.

Em ambos os processos, como anteriormente discutido, a etapa de inóculo se mostrou também um gargalo frente a todas as demais. Naturalmente, equipamentos como os compressores (G-101), filtros de ar (AF-102) e distribuidor de fluxo de ar (FDIS-101) também aparecem como problemáticas nos diagramas, já que estão intrinsecamente associadas ao inóculo e à fermentação principal, seja na alimentação de ar ou na exaustão de gases de ventilação gerados na seção de fermentação.

De forma a minimizar os componentes de custo devido aos equipamentos (custos dependentes da instalação) deve-se projetar o processo, normalmente variando-se a capacidade dos equipamentos e o tamanho do lote, de forma a diminuir a ociosidade dos equipamentos de maior custo e diminuindo assim o custo de processamento por hora nos mesmos.

Em uma análise mais rigorosa deve-se levar em conta também a dificuldade de manutenção dos equipamentos, como por exemplo centrifugas, as quais têm um desgaste muito grande devido à alta rotação, ou colunas cromatográficas de exclusão, que são muito difíceis e demoradas para empacotar. Neste caso deve-se avaliar se não é mais econômico ter um equipamento mais ocioso, de maior capacidade, mas que precise de uma frequência menor de manutenções.

#### 5.4. Análise econômica dos processos

Realizada a simulação e reunidos os dados econômicos referentes aos itens envolvidos nos custos operacionais (itens detalhados no Anexo C) e de capital fixo (itens detalhados no Anexo B), foram gerados pelo SuperPro Design® os relatórios econômicos dos processos envolvidos.

Os custos operacionais envolvidos em cada um dos processos, estão representados pelas Tabelas 11 e 12, que especificam os itens considerados, seus valores totais e percentuais de contribuição para o custo OPEX total em cada um dos processos.

**Tabela 11.** Relação dos custos operacionais (OPEX) envolvidos no processo de produção da L-asparaginase monoPEGuilada.

<b>Item</b>	<b>US\$</b>	<b>%</b>
Matéria-prima/Insumos	5476000,00	40,89
Mão de Obra	965000,00	7,21
Dependentes da instalação	5680000,00	42,41
Consumíveis	1091000,00	8,15
Tratamento de efluentes	163000,00	1,22
Utilidades	17000,00	0,13
<b>TOTAL</b>	<b>13.392.000,00</b>	<b>100,00</b>

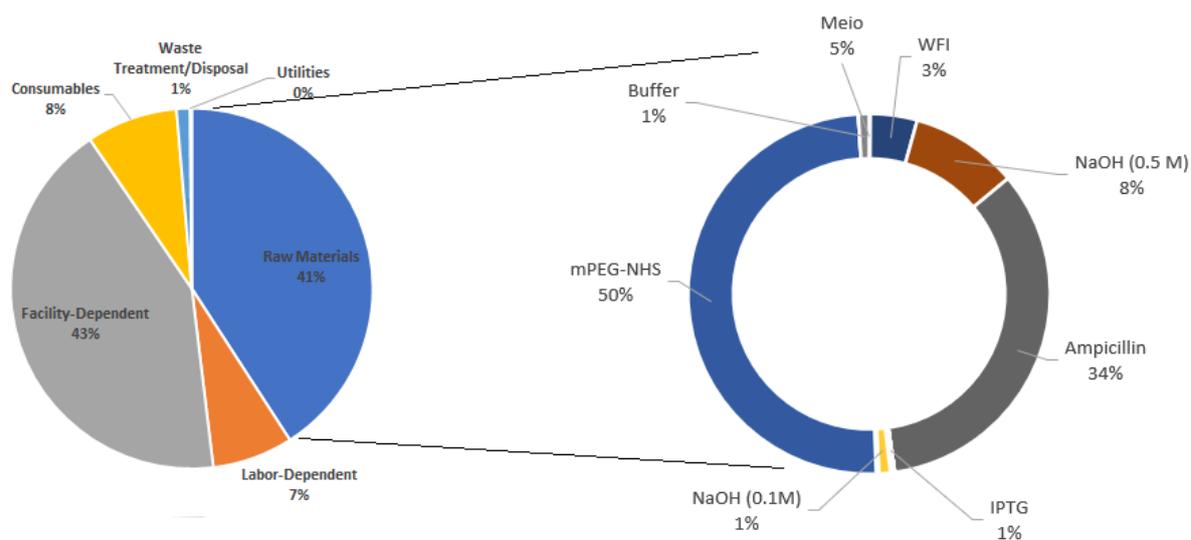
**Tabela 12.** Relação dos custos operacionais (OPEX) envolvidos no processo de produção da L-asparaginase nativa.

<b>Item</b>	<b>US\$</b>	<b>%</b>
Matéria-prima/Insumos	2604000,00	29,92
Mão de Obra	690000,00	7,93
Dependentes da instalação	4472000,00	51,38
Consumíveis	834000,00	9,58
Tratamento de efluentes	94000,00	1,08
Utilidades	10000,00	0,11
<b>TOTAL</b>	<b>8.703.000,00</b>	<b>100,00</b>

Dentre os custos OPEX para ambos os processos, os custos envolvidos com dependentes da instalação foram os mais significativos, representando 40,89% dos custos operacionais no processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada e 51,38% para o processo de produção da L-asparaginase nativa.

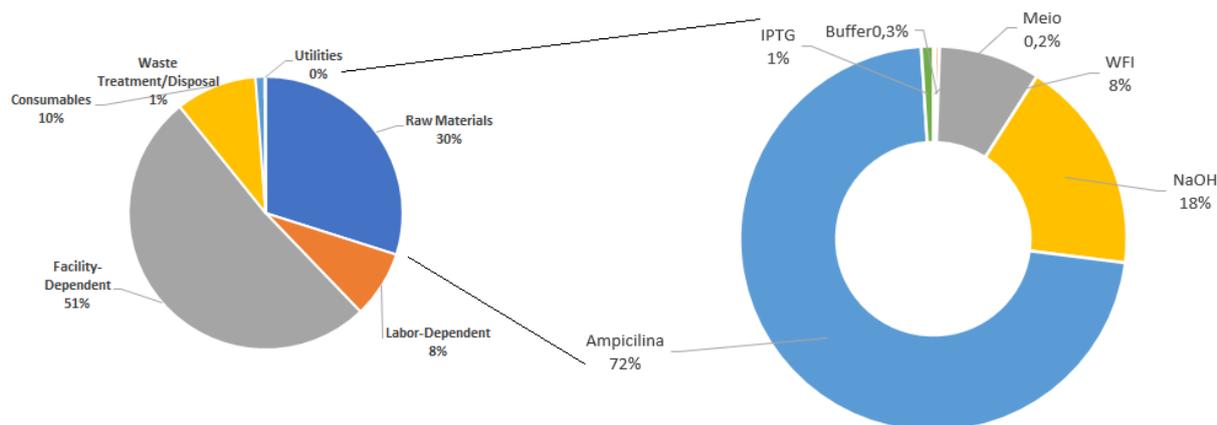
Os custos do item dependentes da instalação representam o custo por hora de uso dos equipamentos e instalações e englobam custos relacionados com as taxas de uso de disponibilidade de equipamentos, manutenção, depreciação, impostos locais, seguros e despesas de fábrica (Ferreira et al., 2018; Konda et al., 2014; SuperPro). Um dos fatores que impacta na composição deste item de custo é o preço dos equipamentos. Neste sentido, como os custos de equipamentos foram adotados com base no banco de dados do SuperPro Design<sup>®</sup>, é provável que estes valores estejam superestimados.

Seguindo os custos dependentes da instalação, em ambos os processos figura o item de “matéria-prima” como segundo fator mais significativo na composição dos custos operacionais, representando 40,89% do OPEX para o processo de produção da enzima PEGuilada e 29,92% para o processo da enzima nativa. As Figuras 22 e 23 ilustram a distribuição dos custos OPEX para cada um dos processos e a distribuição de cada um dos insumos dentro dos custos associados exclusivamente à matéria-prima.



**Figura 22.** Composição dos custos operacionais para o processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada e detalhamento da composição dos custos de matéria-prima (custos do mesmo grupo foram reunidos para evitar gráfico com muitos itens separadamente).

Analogamente, a Figura 23 representa os custos operacionais e a de matéria-prima para o processo de produção da enzima não PEGuilada.



**Figura 23.** Composição dos custos operacionais para o processo de produção de L-asparaginase nativa e detalhamento da composição dos custos de matéria-prima (custos do mesmo grupo foram reunidos para evitar gráfico com muitos itens separadamente).

Como pode ser observado, os maiores custos de matéria-prima envolvidos no processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada são voltados ao PEG utilizado nas etapas de PEGuilação. Naturalmente, com a remoção das etapas de PEGuilação, deixou de existir o custo com o PEG e o percentual de custos de matéria-prima diminuiu em relação ao todo. Em ambos os casos a ampicilina também figurou como um dos insumos mais custosos para os processos de produção.

Para o processo de produção da enzima PEGuilada, o mPEG-NHS corresponde substancialmente à metade dos custos envolvidos com matéria-prima. Neste sentido, tanto do ponto de vista técnico, como do econômico, a etapa de PEGuilação se mostrou também um gargalo do processo, a ser otimizado e verificado. Seja pela etapa de purificação de coluna de exclusão molecular pós-PEGuilação, pelos rendimentos da purificação e pelas perdas envolvidas na reação de PEGuilação ou seja pelo preço do mPEG-NHS e pela alta taxa utilizada (1:50 molar), a seção de PEGuilação foi identificada como um ponto de atenção e de melhoria do processo a ser analisado em etapas futuras.

Tais fatores podem ter levado a custos e valores superestimados no processo de produção da enzima, fazendo com que o custo de produção unitário (UPC) da enzima PEGuilada tenha se mostrado aproximadamente 4 vezes superior em relação ao mesmo fator para a enzima não PEGuilada, de acordo com os dados de simulação deste trabalho. No mercado, por exemplo, a enzima PEGuilada Oncaspar<sup>®</sup> chega a custar 50 vezes mais do que a

enzima não PEGuilada Leuginase<sup>®</sup>, por exemplo. De toda forma, otimizando a reação de PEGuilação e sua respectiva purificação, é muito provável que a diferença de custo de produção da enzima PEGuilada seja significativamente menor do que as 4 vezes aqui estimadas.

Além dos fatores previamente considerados e discutidos, há outros parâmetros e características dos processos que podem vir a ser variados para avaliação de seus impactos no custo de produção da enzima-alvo. Neste sentido, para fins de uma análise de sensibilidade de fatores notadamente deficientes do processo, serão a seguir apresentadas as variações dos custos de produção (UPC) para cada um dos processos variando-se a concentração celular atingida no fermentador principal das plantas simuladas.

Evidentemente a baixa concentração se deve, também, ao meio complexo, ao cultivo em batelada e à produção de subprodutos tóxicos e, em outras condições, seria possível atingir cultivos de alta densidade celular, como já ocorre com *E. coli*.

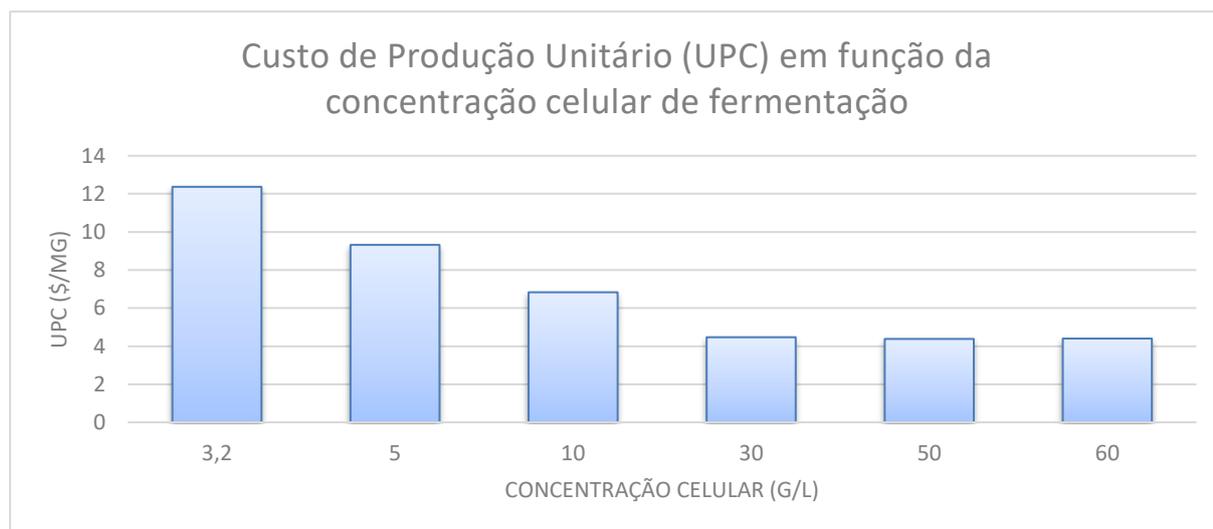
O processo de Torres-Obreque (2017) relata uma concentração celular obtida de 3,2 g/L de célula ao final da fermentação. Entretanto, diversos estudos relatam maiores densidades celulares para cultivos em processos de produção de L-asparaginase, chegando a alcançar 80 g/L, de acordo com dados do nosso próprio grupo de pesquisa. Desta forma, em comparação com outros processos já conhecidos, incluindo o nosso grupo de pesquisa, de fato a concentração final obtida no processo deste trabalho é bem inferior ao que já é alcançado em processos em que o meio de cultura atinge altas densidades (superiores a 50 g/L), sinalizando um potencial ponto de otimização dos processos abordados.

Assim, em comparação com demais processos de produção de L-asparaginase conduzidos em altas densidades, é evidente que um dos pontos que podem ser melhorados no processo em estudo é a concentração celular obtida no fermentador. Com o intuito de verificar o impacto da concentração celular no custo de produção unitário da L-asparaginase monoPEGuilada, foi realizada uma análise de sensibilidade, em que os valores de densidade celular obtidos foram variados (entre 3,2 g/L e 60 g/L) no simulador.

Para tanto, para cada novo valor de concentração celular a ser simulado, foram realizados ajustes no fluxograma, de modo a adaptar o processo à nova concentração adotada. Alguns dos parâmetros do processo, como as áreas de filtro e as correntes das diafiltrações, por exemplo, foram ajustados automaticamente pelo simulador. Por outro lado, as correntes da

PEGuilção e do choque osmótico, por exemplo, precisaram ser remodeladas para se manter nas mesmas condições de processo.

Desta forma, a Figura 24 ilustra um gráfico mostrando as variações do preço de produção unitário (UPC) das enzimas PEGuilada e não PEGuilada para diferentes densidades celulares adotadas para os processos em referência.



**Figura 24.** Custo de produção unitário (UPC), em dólar, da L-asparaginase monoPEGuilada produzida por processos em função de diferentes concentrações celulares na fermentação.

Para a análise de sensibilidade realizada, foram consideradas as seguintes concentrações celulares no fermentador principal e no inóculo: 5 g/L, 10 g/L, 30 g/L, 50 g/L e 60 g/L. Como anteriormente reportado, o UPC da L-asparaginase monoPEGuilada obtida pelo processo em análise (com concentração celular de 3,2 g/L), foi de \$ 12,37/mg; aumentando-se a concentração para 5 g/L, equivalente a 56,25% de aumento, o UPC já diminuiu para \$ 9,32/mg, representando um percentual de redução de aproximadamente 25% no UPC. Da mesma forma, com o aumento da concentração celular, observou-se a redução do UPC até a concentração celular atingir os 30 g/L, quando o UPC atingiu \$ 4,47/mg – aproximadamente 64% inferior ao UPC do processo sob análise. A partir da concentração de 30 g/L, não foi observada redução significativa no valor de UPC, que, para 30 g/L, 50 g/L e 60 g/L, ficou em torno de \$ 4,40/mg.

Consequentemente, com base na análise realizada, é possível reduzir substancialmente o UPC da L-asparaginase otimizando a concentração celular das operações de fermentação do processo sob estudo, de modo a tornar o processo mais eficiente, rentável e atrativo.

O aumento da concentração celular no fermentador altera muito a capacidade de produção instalada da planta (o máximo que a planta consegue produzir) e seria necessário praticamente refazer toda a modelagem do processo, para cada variação de concentração, de forma a se ter pouca ociosidade dos equipamentos, o que pode ser um dos indicadores do porquê de que após determinada densidade celular simulada, os valores de UPC se mantiveram inalterados.

Outros importantes dados obtidos nas análises econômicas são os indicadores econômicos, os quais estão dispostos na Tabela 13, formulada com base nos relatórios obtidos pelas simulações para os dois processos estudados.

**Tabela 13.** Indicadores econômicos obtidos pela simulação no SuperPro Design® para os processos com e sem PEGuilação.

	<b>Processo (1)</b>	<b>Processo (2)</b>	<b>*default SPD</b>
Valor de venda unitário	16,00	4,20	US\$/mg MP
Margem Bruta	22,66	23,06	%
ROI	16,28	14,75	%
Tempo de <i>Payback</i>	6,14	6,78	Anos
VPL (a 7,0% de taxa*)	4886000	1417000	\$

Para a simulação dos indicadores econômicos, é necessário estabelecer um valor de venda unitário para o produto de interesse, devendo evidentemente ser superior ao custo unitário de produção (UPC). Para fins de simulação, e buscando indicadores que mostrem o processo de forma atrativa, foi definido um valor de venda unitário 30% maior do que o UPC, de modo que, para o processo (1) ficou estabelecido como valor de venda unitário \$ 16,00 para cada miligrama de L-asparaginase, enquanto para o processo (2), este valor foi de \$ 4,20/mg.

Para os dois processos simulados, foram encontrados – dada a hipótese assumida do valor de venda, que inclusive são compatíveis com os valores da Tabela 11 – valores de VPL positivos, indicando que são projetos atrativos quando considerados todo o seu tempo de vida

e as variações monetárias incorridas durante este dado período. Vale lembrar que projetos são considerados atrativos, segundo o método VPL, quando são iguais ou maiores do que zero. De acordo com esta abordagem, ambos os processos se mostram, portanto, atrativos para investimentos.

Da mesma forma, o valor de margem bruta ficou em torno dos 20% para os dois bioprocessos, indicando, de maneira geral, uma lucratividade para os produtos dos dois processos. Os valores de margem bruta para biofármacos, de acordo com a análise de dados de processos de simulação de Heinzle (2006), oscilam entre 15 e 25%, dependendo do grau de inovação, dos preços de mercado e da demanda. Desta maneira, os dados simulados também mostram que estes processos têm capacidade de gerar produtos que sejam lucrativos para seus investidores, embora os processos ainda careçam de diversas otimizações.

Os tempos de *payback*, de aproximadamente 6 anos tanto para o processo da L-asparaginase monoPEGuilada quanto para o processo de produção da versão nativa, mostram-se também razoáveis para o retorno de investimento de plantas industriais, sobretudo complexas, como as de bioprocessos.

Assim, de forma geral, em ambos os processos, foram obtidos indicadores atrativos, ainda mais considerando que os processos sob análise ainda não são otimizados e possuem diversos pontos que podem ser aperfeiçoados, de modo de tornar os referidos processos ainda mais viáveis.

Entretanto, cabe ressaltar que as simulações não abrangeram as etapas de formulação e apenas da produção do princípio ativo e não de suas formas finais. Assim, é evidente que a adição de tais etapas faltantes irão impactar nos custos de UPC obtidos.

## 6 CONCLUSÃO

As simulações e os resultados obtidos por esta dissertação possibilitaram fazer uma primeira avaliação dos pontos de vista técnico e econômico para a produção em escala piloto de um biofármaco de L-asparaginase desenvolvido por Torres-Obreque (2017).

De modo geral, e cumprindo com um dos objetivos da análise proposta, foram identificados pontos do processo considerados como gargalos e que merecem atenção em futuros desenvolvimentos para que o processo seja otimizado, tais como a baixa densidade celular na fermentação, a avaliação do meio de cultivo, a verificação das concentrações de endotoxinas e contaminantes, bem como a implementação de operações para colocar o medicamento dentro dos padrões regulatórios, o longo tempo de fermentação, a reavaliação das colunas utilizadas, a proporção de enzima:PEG e o estudo das operações adicionadas para adaptar o processo laboratorial à escala piloto.

Neste sentido, frente a tantos pontos e gargalos que foram identificados, é evidente que os valores obtidos e estimados por este projeto, embora representativos, ainda são distantes de dados reais, mas mesmo assim são capazes de fornecer uma ordem de custo de produção, os quais não ficaram fora da ordem de valor dos produtos encontrados no mercado. Haja vista a diversidade de pontos que podem ser otimizados e as hipóteses assumidas para as estimativas, esta primeira análise indica uma viabilidade da produção nacional da L-asparaginase, a qual deverá ser comprovada com a continuidade de estudos de melhoria de processo e análises mais rigorosas de viabilidade técnico-econômica. Evidência de tais afirmações são, por exemplo, os resultados obtidos em uma análise de sensibilidade simplificada, que mostrou uma queda substancial no UPC com o aumento da densidade celular (até certo ponto, em que o dimensionamento da planta fica comprometido).

De toda forma, mesmo necessitando de otimizações, o processo, de acordo com a planta simulada, tem capacidade de abastecer a demanda nacional de L-asparaginase, podendo superá-la. Nos cenários considerados, os custos unitários de produção (US\$ 16,00/mg para a L-asparaginase monoPEGuilada e US\$ 4,20 para a L-asparaginase nativa) são comparáveis a algumas versões de biofármacos já comercializados, como a Spectrila<sup>®</sup> e a Leuginase<sup>®</sup>, sendo muito menor em relação à versão PEGuilada disponível – a Oncaspar<sup>®</sup>. Inclusive, se comparando os dados obtidos para a L-asparaginase monoPEGuilada com os dados da Oncaspar<sup>®</sup> (única versão PEGuilada atualmente disponível), foi estimado um valor de UPC,

para a L-asparaginase monoPEGuilada, aproximadamente 4 vezes superior em relação ao UPC para a enzima não PEGuilada, o que é uma razão muito inferior em relação aos preços praticados para as formas PEGuilada e nativa (no caso, Oncaspar® e Leuginase®, cujos valores são US\$ 1.619,10 e US\$ 38, respectivamente).

Os dados simulados também mostram que estes processos têm capacidade de gerar produtos que sejam lucrativos para seus investidores, embora os processos ainda careçam de diversas otimizações, uma vez que os indicadores econômicos, como *payback*, NPV e ROI, de acordo com a literatura, já se mostram dentro de faixas esperadas, ainda que o processo nitidamente necessite de aprimoramentos.

## 7 ETAPAS FUTURAS

Os resultados obtidos por este projeto focaram em avaliar primeiramente, sob os pontos de vista técnico e econômico, e levantaram interessantes questões, etapas e características do processo em estudo, que podem ser abordadas em estudos futuros, a exemplo dos tópicos a seguir dispostos.

- Introdução das operações de diafiltração no processo, para a obtenção de dados e parâmetros experimentais;
- Mudança do meio de cultivo e do método de cultivo (meio mínimo e processo em batelada alimentada);
- Otimização da etapa de PEGuilação, sobretudo em relação à proporção enzima: PEG;
- Determinação das concentrações de endotoxinas e, com base em tal resultado, verificar a necessidade de etapas específicas de purificação;
- Avaliação da substituição da coluna SEC na etapa de purificação;
- Realização de análise de sensibilidade para outros fatores do processo;
- Condução experimental de fermentação atingindo maiores densidades celulares;
- Estudo e desenvolvimento das etapas finais de formulação;
- Refinamento contínuo da simulação com base em novos dados e características do processo.

## BIBLIOGRAFIA

ALI, U.; NAVEED, M.; ULLAH, A.; ALI, K.; SHAH, S. A.; FAHAD, S.; MUMTAZ, A. S. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 199–210, 2016.

AVRAMIS, V. I. Asparaginases: Biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer Research**, v. 32, n. 7, p. 2423–2437, 2012.

AZMI, W.; NARTA, U.; SINGH, N.; GUPTA, V.; KANWAR, S.; DEVI, S. An Antileukemic Glutaminase Free L-Asparaginase from *Bacillus brevis*. **Current Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 58–68, 2017.

BEER, A. **Modelling and Simulation Based Assessment in Sustainable Bioprocess Development**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Cidade do Cabo: University of Cape Town, p. 242, 2011.

BENAVIDE, V. G. **Panorama sobre alguns entraves e desafios na produção nacional de biofármacos**. Especialização (Tecnologias Industriais Farmacêuticas) - Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, p. 44, 2013.

BRANDÃO, C. Z. G. DE S.; SOUZA, J. N. DE. Biofármacos: da pesquisa ao mercado: uma revisão da literatura. **Saúde & Ciência Em Ação**, v. 1, n. 1, p. 105–118, 2015.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**, v. 191, n. 4793, p. 1114–1115, 1961.

BRUMANO, L. P.; SILVA, F. V. S. DA; COSTA-SILVA, T. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SANTOS, J. H. P. M.; KLEINGESINDS, E. K.; MONTEIRO, G.; RANGEL-YAGUI, C. DE O.; BENYAHIA, B.; JUNIOR, A. P. **Development of L-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles** **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** Frontiers Media S.A., v. 6, 2019.

CÂMARA DOS DEPUTADOS. **Esclarecimentos L-Asparaginase**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/65379833-Esclarecimentos-l-asparaginase-camara-dos-deputados-maio-de-2017.html>>. Acesso em: 29 out. 2020.

CARREIRA, A. C.; LEVIN, G.; COELHO, T. M.; BELCHIOR, G. G.; SOGAYAR, M. C. Biofármacos : sua importância e as técnicas utilizadas em sua produção. **Genética na Escola**, v. 8, p. 168–176, 2013.

CHAROENSIDDHI, S.; LORBEER, A. J.; FRANCO, C. M. M.; SU, P.; CONLON, M. A.; ZHANG, W. Process and economic feasibility for the production of functional food from the brown alga *Ecklonia radiata*. **Algal Research**, v. 29, p. 80–91, 2018.

CLARKSON, B.; KRAKOFF, I.; BURCHENAL, J.; KARNOFSKY, D.; GOLBEY, R.; DOWLING, M.; OETTGEN, H.; LIPTON, A. Clinical results of treatment with E. coli L-asparaginase in adults with leukemia, lymphoma, and solid tumors. **Cancer**, v. 25, n. 2, p. 279–305, 1970.

DIVINO, B. **Produção biotecnológica de L-asparaginase ( ASP1 ) de Saccharomyces cerevisiae em sistema de expressão heterólogo Pichia pastoris**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica), São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, p. 88, 2015.

DORAN, P. **Bioprocess Engineering Principles** . 1. ed., 1995.

FARDELONE, L.; BRANCHI, B. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil Biopharmaceutical sector and opportunities for Brazil. **Fae.Edu**, v. 9, n. 2, p. 29–38, 2007.

FARID, S. S. Established bioprocesses for producing antibodies as a basis for future planning. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** Springer, Berlin, Heidelberg, v. 101, 2006.

FERREIRA, R. D. G.; AZZONI, A. R.; FREITAS, S. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using E. coli: The case of recombinant  $\beta$ -glucosidase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.

HALL, M.; HILL, D.; PAVÉ, G. **Global Pharmaceuticals**. [s.l], 2019. Disponível em: <<https://www.hardmanandco.com/wp-content/uploads/2019/04/Global-Pharmaceuticals-2018-statistics-9-April-2019.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2020.

HASSAN, S.; SIMARIA, A. S.; VARADARAJU, H.; GUPTA, S.; WARREN, K.; FARID, S. S. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: Downstream processing decisions. **Regenerative Medicine**, v. 10, n. 5, p. 591–609, 2015.

HEINZLE, E.; BIWER, A. P.; COONEY, C. L. Development of Sustainable Bioprocesses: Modeling and Assessment. **John Wiley & Sons, Ltd.** [s.l.], 2006.

HUTTNER, S. Knowledge and the Biotechnology Economy: A Case of Mistaken Identity. **Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical**, p. 1689–1699, 1999.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **The Journal of experimental medicine**, v. 98, n. 6, p. 565–582, 1953.

KONDA, N. M.; SHI, J.; SINGH, S.; BLANCH, H. W.; SIMMONS, B. A.; KLEIN-MARCUSCHAMER, D. Understanding cost drivers and economic potential of two variants of ionic liquid pretreatment for cellulosic biofuel production. **Biomed Central**, vol. 7, n. 86, 2014.

KURRE, H. A.; ETTINGER, A. G.; VEENSTRA, D. L.; GAYNON, P. S.; FRANKLIN, J.; SENCER, S. F.; REAMAN, G. H.; LANGE, B. J.; HOLCENBERG, J. S. A Pharmacoeconomic Analysis of Pegaspargase Versus Native Escherichia Coli L-Asparaginase for the Treatment of Children With Standard-Risk, Acute Lymphoblastic Leukemia: The Children's Cancer Group Study (CCG-1962). **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 24, n. 3, p. 175–181, 2002.

LINDSLEY, C. W. New 2017 Data and Statistics for Pharmaceutical Products. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 1518–1519, 2018.

LOPES, A. M.; OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; RIBEIRO, A.; TAIRUM JR. C. A.; BREYER, C. A.; OLIVEIRA, M. A.; MONTEIRO, G.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MAGALHÃES, P. O.; AVENDAÑO, J. G. F.; CAVACO-PAULO, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; SETTE, L. D.; CONVERTI, A.; PESSOA-JUNIOR, A. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82–99, 2015.

MADEIRA, L.; BORSCHIVER, S.; PEREIRA JR, N. **Identificação de Biofármacos para Produção no Brasil**. p. 321–326, 2013.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of l-asparaginase from Escherichia coli Archives of Biochemistry and Biophysics. **Arch Biochem Biophys**, v. 105, n. 2, p. 450-453, 1964.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Informativa Conjunta n.º 01/2017 - DAF/SCTIE/MS E DAET/SAS/MS.** Disponível em: <[http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/07/Nota Informativa Conjunta 01-2017 DAF-DAET.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/07/Nota%20Informativa%20Conjunta%2001-2017%20DAF-DAET.pdf)>. Acesso em: 29 out. 2020.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, n. 2, p. 97–113, 1998.

MUSSATTO, S. I.; AGUIAR, L. M.; MARINHA, M. I.; JORGE, R. C.; FERREIRA, E. C. Economic analysis and environmental impact assessment of three different fermentation processes for fructooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 673–681, 2015.

MUSSATTO, S. I.; MONCADA, J.; ROBERTO, I. C.; CARDONA, C. A. Techno-economic analysis for brewer's spent grains use on a biorefinery concept: The Brazilian case. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 302–310, 2013.

NAGARETHINAM, S.; NAGAPPA, A. N.; N, U.; J, V. R.; B, M. V. Microbial L-Asparaginase and its future prospects. **Asian Journal of Medical Research**, v. 1, n. 4, p. 159–168, 2012.

NANDI, S.; KWONG, A. T.; HOLTZ, B. R.; ERWIN, R. L.; MARCEL, S.; MCDONALD, K. A. Techno-economic analysis of a transient plant-based platform for monoclonal antibody production. **mAbs**, v. 8, n. 8, p. 1456–1466, 2016.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, n. 3, p. 208–221, 2007.

NEUMAN, R. E.; MCCOY, T. A. Dual Requirement of Walker Carcinosarcoma 256 in vitro for Asparagine and Glutamine. **Science**, v. 124, n. 3212, p. 124–125, 1956.

OSSEWEIJER, P.; STRAATHOF, A. **Process Economics.** Disponível em: <<http://delftxdownloads.tudelft.nl/TBP01x-BiobasedProducts/Week6/TBP01x-6.2-slides.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2020.

PEREIRA JR., N.; BON, E. P. DA S.; FERRARA, M. A. **SÉRIES EM BIOTECNOLOGIA - Tecnologia de Bioprocessos.** Rio de Janeiro, v. 1, 2008.

PERES, B. S.; PADILHA, G.; QUENTAL, C. Questões relevantes para a aprovação de medicamentos biossimilares. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 4, p. 748–760, 2012.

PESSOA-JUNIOR, A. **Produção de L-asparaginase extracelular: da bioprospeção à engenharia de um biofármaco antileucêmico**. FAPESP Processo 13/08617-7. Disponível em: <<https://bv.fapesp.br/pt/auxilios/84948/producao-de-l-asparaginase-extracelular-da-bioprospecao-a-engenharia-de-um-biofarmaco-antileucemic/>>. Acesso em: 29 out. 2020.

PETRIDES, D.; CARMICHAEL, D.; SILETTI, C.; KOULOURIS, A. Biopharmaceutical process optimization with simulation and scheduling tools. **Bioengineering**, v. 1, n. 4, p. 154–187, 2014.

PETRIDES, D. P.; KOULOURIS, A.; LAGONIKOS, P. T. The role of process simulation in pharmaceutical process development and product commercialization. **Pharmaceutical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 56–65, 2002.

PIETERS, R.; HUNGER, S. P.; BOOS, J.; RIZZARI, C.; SILVERMAN, L.; BARUCHEL, A.; GOEKBUGET, N.; SCHRAPPE, M.; PUI, C. H. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2011.

PUI, C. H.; LIU, Y.; RELING, M. V. How to solve the problem of hypersensitivity to asparaginase? **Pediatric Blood and Cancer**, v. 65, n. 3, p. 19–20, 2018.

ROUF, S. A.; DOUGLAS, P. L.; MOO-YOUNG, M.; SCHARER, J. M. Computer simulation for large scale bioprocess design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, n. 3, p. 229–234, 2001.

SALERNO, M.; MATSUMOTO, C.; FERAZ, I. **Biofármacos no Brasil: Características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento**. IPEA, 2018.

SCHEINBERG, M. A.; FELIX, P. A. O.; KOS, I. A.; ANDRADE, M. D. A.; AZEVEDO, V. F. Partnership for productive development of biosimilar products: perspectives of access to biological products in the Brazilian market. **Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein**, Sao Paulo, 17 set. 2018.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 2, 2001.

STONIER, A. **A Dynamic Decision Support Tool For Use in The Design of Bio-manufacturing Facilities and Processes**. Tese (Doutorado em Engenharia) - Departamento de Engenharia Bioquímica. Londres: University College London, p. 141, 2010.

TANAKA, R. L.; AMORIM, M. C. S. O mercado e as possibilidades da indústria de biofármacos no Brasil. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 16, n. 2, p. 86–92, 2014.

TONG, W. H.; SLUIS, I. M. VAN DER; ALLEMAN, C. J. M.; LITSENBURG, R. R. L. VAN; KASPERS, G. J. L.; PIETERS, R.; UYL-DE GROOT, C. A. Cost-analysis of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia with asparaginase preparations: The impact of expensive chemotherapy. **Haematologica**, v. 98, n. 5, p. 753–759, 2013.

TORRES-OBREQUE, K. M. **Desenvolvimento de L-asparaginase peguilada de E. chrysanthemi para o tratamento de leucemias**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) - São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, p. 88, 2017.

TORRES-OBREQUE, K.; MENEGUETTI, G. P.; CUSTÓDIO, D.; MONTEIRO, G.; PESSOA-JUNIOR, A.; RANGEL-YAGUI, C. Production of a novel N-terminal PEGylated crisantaspase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 281–289, 2019.

TOUMI, A.; JÜRGENS, C.; JUNGO, C.; MAIER, B. A.; PAPAVALASILEIOU, V.; PETRIDES, D. P. Design and optimization of a large scale biopharmaceutical facility using process simulation and scheduling tools. **Pharmaceutical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 1–9, 2010.

TURTON, R.; SHAEIWITZ, J. A.; BHATTACHARYYA, D.; WHITING, W. B. **Analysis, synthesis, and design of chemical processes**. 5. ed. Boston: Prentice Hall, 2018.

URTI, C. T.; SOARES, M. C. C.; VARGAS, M. Priorização das necessidades do sistema público de saúde e produção de ciência, tecnologia e inovação no Brasil. **Revista Iberoamericana de ciencia, tecnología y sociedad**, v. 14, n. 40, p. 135–135, 2019.

VAZZOLER, A. **Introdução ao estudo das viabilidades técnica e econômica de processos químicos - Estimativas de custo para projetos conceituais e anteprojetos**. Campinas, p. 487, 2017.

WILSON, J. M. Gantt charts: A centenary appreciation. **European Journal of**

**Operational Research**. v. 149, n. 2, p. 430-437, 2003.

ZENATTI, P. P.; MIGITA, N. A.; CURY, N. M.; MENDES-SILVA, R. A.; GOZZO, F. C.; CAMPOS-LIMA, P. O. DE; YUNES, J. A.; BRANDALISE, S. R. Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of E. coli L-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **EBioMedicine**, v. 30, p. 158–166, 2018.

ZHANG, W. **Techno-Economic Analysis (TEA) and Environmental Impact Assessment (EIA) of corn biorefinery and bioprocessing operation Recommended Citation**. Tese (Doutorado em Engenharia de Biosistemas e Agricultura) - Iowa: Iowa State University, p. 302, 2017.

ŽIŽLAVSKÝ, O. Net Present Value Approach: Method for Economic Assessment of Innovation Projects. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 156, p. 506–512, 2014.

## ANEXO A

Relação de equipamentos, suas especificações e preços, obtidos por meio da biblioteca do SuperPro Design<sup>®</sup>, com valores atualizados para o ano de 2019.

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (\$)	Cost (\$)
1 / 0 / 0	V-101	Blending Tank Vessel Volume = 400.56 L	209000,00	209000,00
1 / 0 / 0	ST-101	Heat Sterilizer Rated Throughput = 90.12 L/h	147000,00	147000,00
1 / 0 / 0	V-102	Blending Tank Vessel Volume = 39.00 L	182000,00	182000,00
1 / 0 / 0	ST-102	Heat Sterilizer Rated Throughput = 8.78 L/h	147000,00	147000,00
1 / 0 / 0	FR-101	Fermentor Vessel Volume = 500.00 L	727000,00	727000,00
1 / 0 / 0	101 SFR-	Seed Fermentor Vessel Volume = 50.00 L	613000,00	613000,00
1 / 0 / 0	AF-101	Air Filter Rated Throughput = 2242.84 L/h	9000,00	9000,00
1 / 0 / 0	G-101	Centrifugal Compressor Compressor Power = 0.66 kW	90000,00	90000,00
1 / 0 / 0	AF-102	Air Filter Rated Throughput = 1326.47 L/h	9000,00	9000,00
1 / 0 / 0	AF-103	Air Filter Rated Throughput = 136825.57 L/h	9000,00	9000,00
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Throughput = 390.16 L/h	248000,00	248000,00
1 / 0 / 0	DS-102	Disk-Stack Centrifuge Throughput = 126.93 L/h	137000,00	137000,00
1 / 0 / 0	DE-101	Dead-End Filter Filter Area = 10.00 m2	50000,00	50000,00
1 / 0 / 0	C-101	Column PBA Chromatography Column Volume = 0.40 L	170000,00	170000,00
1 / 0 / 0	DF-101	Diafilter Membrane Area = 2.95 m2	35000,00	35000,00
1 / 0 / 0	C-102	Column GFL Chromatography	154000,00	154000,00

			Column Volume =		
		18.76 L			
1 / 0 / 0	V-104		Blending Tank	182000,00	182000,00
			Vessel Volume =		
		142.49 L			
1 / 0 / 0	V-107		Vertical-On-Legs	23000,00	23000,00
			Tank		
			Vessel Volume =		
		135.68 L			
1 / 0 / 0	V-103		Receiver Tank	62000,00	62000,00
			Vessel Volume =		
		433.51 L			
1 / 0 / 0	DF-102		Diafilter	35000,00	35000,00
			Membrane Area =		
		0.08 m2			
1 / 0 / 0	V-108		Receiver Tank	62000,00	62000,00
			Vessel Volume =		
		41.72 L			
1 / 0 / 0	V-110		Blending Tank	182000,00	182000,00
			Vessel Volume = 1.04		
		L			
1 / 0 / 0	DF-103		Diafilter	35000,00	35000,00
			Membrane Area =		
		0.47 m2			
1 / 0 / 0	DE-102		Dead-End Filter	50000,00	50000,00
			Filter Area = 10.00 m2		
1 / 0 / 0	V-109		Receiver Tank	62000,00	62000,00
			Vessel Volume = 1.04		
		L			
1 / 0 / 0	V-105		Vertical-On-Legs	23000,00	23000,00
			Tank		
			Vessel Volume =		
		135.53 L			
1 / 0 / 0	V-106		Vertical-On-Legs	23000,00	23000,00
			Tank		
			Vessel Volume = 6.78		
		L			
			Unlisted Equipment		918000,00
				<b>TOTAL</b>	<b>4592000,00</b>

## ANEXO B

Relação dos custos fixos (CAPEX), suas especificações e preços, obtidos por meio do SuperPro Design®, com valores atualizados para o ano de 2019.

### Processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada

A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	4592000,00
2. Installation	1687000,00
3. Process Piping	1607000,00
4. Instrumentation	1837000,00
5. Insulation	138000,00
6. Electrical	459000,00
7. Buildings	2066000,00
8. Yard Improvement	689000,00
9. Auxiliary Facilities	1837000,00
<b>TPDC</b>	<b>14912000,00</b>
B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)	
10. Engineering	3728000,00
11. Construction	5219000,00
<b>TPIC</b>	<b>8947000,00</b>
C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)	
<b>TPC</b>	<b>23859000,00</b>
D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)	
12. Contractor's Fee	1193000,00
13. Contingency	2386000,00
<b>CFC = 12+13</b>	<b>3579000,00</b>
E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)	
<b>DFC</b>	<b>27437000,00</b>

### Processo de produção de L-asparaginase nativa

<b>A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)</b>	
1. Equipment Purchase Cost	3939000,00
2. Installation	1482000,00
3. Process Piping	1379000,00
4. Instrumentation	1576000,00
5. Insulation	118000,00
6. Electrical	394000,00
7. Buildings	1773000,00
8. Yard Improvement	591000,00
9. Auxiliary Facilities	1576000,00
<b>TPDC</b>	<b>12828000,00</b>
<b>B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)</b>	
10. Engineering	3207000,00
11. Construction	4490000,00
<b>TPIC</b>	<b>7697000,00</b>
<b>C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)</b>	
<b>TPC</b>	<b>20525000,00</b>
<b>D. Contractor's Fee &amp; Contingency (CFC)</b>	
12. Contractor's Fee	1026000,00
13. Contingency	2052000,00
<b>CFC = 12+13</b>	<b>3079000,00</b>
<b>E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)</b>	
<b>DFC</b>	<b>23603000,00</b>

## ANEXO C

Relação dos custos operacionais (OPEX), suas especificações e preços, obtidos por meio do SuperPro Design®, com valores atualizados para o ano de 2019. Os custos dos insumos e matérias-primas foram obtidos pela plataforma digital do molbase (www.molbase.com).

Processo de produção de L-asparaginase monoPEGuilada

### LABOR COST - PROCESS SUMMARY

Labor Type	Unit Cost (\$/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (\$)	%
Operator	13,80	60435,00	834003,00	100,00
<b>TOTAL</b>		<b>60435,00</b>	<b>834003,00</b>	<b>100,00</b>

### MATERIALS COST - PROCESS SUMMARY

Bulk Material	Unit Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	%
Sodium Chloride	0,10	700,00	Kg	70,00	0,00
Tryptone	3,00	1416,00	Kg	4248,00	0,08
Water	0,18	6567,00	MT	1182,00	0,02
Yeast Extract	2,30	700,00	Kg	1610,00	0,03
HCl (0.5 M)	0,00	374657,00	Kg	0,00	0,00
RO Water	0,18	2720,00	MT	490,00	0,01
WFI	0,20	1039849,00	Kg	207970,00	4,05
NaOH (0.5 M)	0,20	2393451,00	Kg	477283,00	9,30
Ampicillin	50,00	32618,00	Kg	1630900,00	31,78
IPTG	0,40	2,00	Kg	1,00	0,00
Air	0,00	69899,00	Kg	0,00	0,00
EDTA Disodium	2,74	102,00	Kg	279,00	0,01
Sucrose	1,53	8916,00	Kg	13642,00	0,27
TRIS HCl	18,00	136,00	Kg	2446,00	0,05
TF 20mM pH 5.5	0,20	22919,00	Kg	4582,00	0,09
NaOH (0.1M)	0,00	493403,00	Kg	0,00	0,00
TF 20mM pH 7,5	0,20	71150,00	Kg	14223,00	0,28
NaCl (1 M)	0,01	147,00	Kg	1,00	0,00
mPEG-NHS	185,00	14992,00	G	2773557,00	54,04
Hydroxylammoniu	0,60	4,00	Kg	3,00	0,00
H3PO4 (20% w/w)	0,00	471616,00	Kg	0,00	0,00
<b>TOTAL</b>				<b>5132485,00</b>	<b>100,00</b>

NOTE: Bulk material consumption amount includes material used as:

- Raw Material
- Cleaning Agent
- Heat Transfer Agent (if utilities are included in the operating cost)

### VARIOUS CONSUMABLES COST (2019 prices) - PROCESS SUMMARY

Consumable	Units Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	%
Dft DEF Cartridge	1000,00	718,00	Item	718000,00	72,19
Dft PBA Chrom Resin	1500,00	4,00	L	5352,00	0,54
Dft Membrane	400,00	5,00	m2	1879,00	0,19
Dft Gel Filtration Resin	2000,00	135,00	L	269395,00	27,09
<b>TOTAL</b>				<b>994626,00</b>	<b>100,00</b>

### WASTE TREATMENT/DISPOSAL COST (2019 prices) - PROCESS SUMMARY

Waste Category	Unit Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	%
Solid Waste				0,00	0,00
S-131	4,07	0,00	MT	0,00	0,00
Aqueous Liquid				221353,00	100,00
S-119	1,71	2081,00	kg	3558,00	1,61
S-123	0,01	3456,00	kg	33,00	0,01
S-135	0,01	66355,00	kg	630,00	0,28
S-107	1,71	126593,00	kg	216475,00	97,80
S-127	0,01	55704,00	kg	529,00	0,24
S-133	0,01	13424,00	kg	128,00	0,06
Organic Liquid				0,00	0,00
Emissions				0,00	0,00
<b>TOTAL</b>				<b>221353,00</b>	<b>100,00</b>

### UTILITIES COST (2019 prices) - PROCESS SUMMARY

Utility	Unit Cost (\$)	Annual Amount	Ref. Units	Annual Cost (\$)	%
Std Power	0,13	17306,00	kW-h	2250,00	10,64
Steam	12,53	20,00	MT	251,00	1,19
Cooling Water	12,53	1021,00	MT	12793,00	60,47
Chilled Water	12,53	465,00	MT	5822,00	27,52
NaCl Brine	0,25	152,00	MT	38,00	0,18
<b>TOTAL</b>				<b>21154,00</b>	<b>100,00</b>

### ANNUAL OPERATING COST (2019 prices) - PROCESS SUMMARY

Cost Item	\$	%
Raw Materials	5132000,00	41,48
Labor-Dependent	834000,00	6,74
Dependentes da instalação	5169000,00	41,78
Consumables	995000,00	8,04
Waste Treatment/Disposal	221000,00	1,79
Utilities	21000,00	0,17
Transportation	0,00	0,00
Miscellaneous	0,00	0,00
Advertising/Selling	0,00	0,00
Running Royalties	0,00	0,00
Failed Product Disposal	0,00	0,00
<b>TOTAL</b>	<b>12373000,00</b>	<b>100,00</b>

### PROFITABILITY ANALYSIS (2019 prices)

A.	Direct Fixed Capital	27437000,00 \$
B.	Working Capital	565000,00 \$
C.	Startup Cost	1372000,00 \$
D.	Up-Front R&D	0,00 \$
E.	Up-Front Royalties	0,00 \$
F.	Total Investment (A+B+C+D+E)	29375000,00 \$
G.	Investment Charged to This Project	29375000,00 \$

## Processo de produção de L-asparaginase nativa

### LABOR COST - PROCESS SUMMARY

Labor Type	Unit Cost (\$/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (\$)	%
Operator	13,80	41398,00	571291,00	100,00
<b>TOTAL</b>		<b>41398,00</b>	<b>571291,00</b>	<b>100,00</b>

### MATERIALS COST - PROCESS SUMMARY

Bulk Material	Unit Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	Cost %
Sodium Chloride	0,10	375,00	kg	37,00	0,00
Tryptone	3,00	758,00	kg	2273,00	0,10
Water	0,18	4793,00	MT	863,00	0,04
Yeast Extract	2,30	375,00	kg	861,00	0,04
HCl (0.5 M)	0,00	362422,00	kg	0,00	0,00
RO Water	0,18	2607,00	MT	469,00	0,02
WFI	0,20	975066,00	kg	195013,00	8,82
NaOH (0.5 M)	0,20	1846510,00	kg	368216,00	16,66
Ampicillin	50,00	32615,00	kg	1630766,00	73,79
IPTG	0,40	1,00	kg	1,00	0,00
Air	0,00	37399,00	kg	0,00	0,00
EDTA Disodium	2,74	55,00	kg	149,00	0,01
Sucrose	1,53	4771,00	kg	7299,00	0,33
TRIS HCl	18,00	73,00	kg	1308,00	0,06
TF 20mM pH 5.5	0,20	12263,00	kg	2452,00	0,11
NaOH (0.1M)	0,00	448330,00	kg	0,00	0,00
TF 20mM pH 7,5	0,20	1082,00	kg	216,00	0,01
NaCl (1 M)	0,01	79,00	kg	0,00	0,00
<b>TOTAL</b>				<b>2209925,00</b>	<b>100,00</b>

NOTE: Bulk material consumption amount includes material used as:  
 -Raw Material  
 -Cleaning Agent  
 - Heat Transfer Agent (if utilities are included in the operating cost)

### VARIOUS CONSUMABLES COST (2019 prices) - PROCESS SUMMARY

Consumable	Units Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	%
Dft DEF Cartridge	1000,00	718,00	item	718000,00	99,49
Dft PBA Chrom Resin	1500,00	2,00	L	2864,00	0,40
Dft Membrane	400,00	2,00	m2	816,00	0,11
<b>TOTAL</b>				<b>721679,00</b>	<b>100,00</b>

### WASTE TREATMENT/DISPOSAL COST (2019 prices) - PROCESS SUMMARY

Waste Category	Unit Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	%
Solid Waste				0,00	0,00
S-131	4,07	0,00	MT	0,00	0,00
Aqueous Liquid				118083,00	100,00
S-119	1,71	1113,00	kg	1904,00	1,61
S-123	0,01	1849,00	kg	18,00	0,01
S-135	0,01	35503,00	kg	337,00	0,29
S-107	1,71	67734,00	kg	115824,00	98,09
Organic Liquid				0,00	0,00
Emissions				0,00	0,00
<b>TOTAL</b>				<b>118083,00</b>	<b>100,00</b>

### UTILITIES COST (2019 prices) - PROCESS SUMMARY

Utility	Unit Cost (\$)	Annual Amount	Ref. Units	Annual Cost (\$)	%
Std Power	0,13	10708,00	kW-h	1392,00	12,04
Steam	12,53	15,00	MT	192,00	1,66
Cooling Water	12,53	546,00	MT	6845,00	59,20
Chilled Water	12,53	248,00	MT	3113,00	26,92
NaCl Brine	0,25	82,00	MT	20,00	0,18
<b>TOTAL</b>				<b>11562,00</b>	<b>100,00</b>

---

**ANNUAL OPERATING COST (2019 prices) - PROCESS SUMMARY**

<b>Cost Item</b>	<b>\$</b>	<b>%</b>
Raw Materials	2210000,00	27,36
Labor-Dependent	571000,00	7,07
Dependentes da instalação	4446000,00	55,03
Consumables	722000,00	8,93
Waste Treatment/Disposal	118000,00	1,46
Utilities	12000,00	0,14
Transportation	0,00	0,00
Miscellaneous	0,00	0,00
Advertising/Selling	0,00	0,00
Running Royalties	0,00	0,00
Failed Product Disposal	0,00	0,00
<b>TOTAL</b>	<b>8078000,00</b>	<b>100,00</b>